

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

5

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference M29314PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/EP00/05006 | International filing date (day/month/year) 31 May 2000 (31.05.00) | Priority date (day/month/year) 01 June 1999 (01.06.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/025 | | |
| Applicant MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT | | |

| | |
|--|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> | |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> | |

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 31 October 2000 (31.10.00) | Date of completion of this report 07 September 2001 (07.09.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP00/05006

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-42 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-27 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/8-8/8 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____ 50-78 _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☐ not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-27

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.

The common inventive idea that forms the basis of the present application can be seen as that of making available papillomavirus T-cell epitopes. However, since such epitopes have already been described in the prior art (see the documents cited in the international search report), this common idea is invalid. Each of the claimed peptides thus represents a separate invention (PCT Rule 13.1-13.3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/05006

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|------------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-27 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-27 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-24, 26, 27 | YES |
| | Claims | 25: see Box VIII | NO |

2. Citations and explanations

No novelty can be recognized for the present claims on the basis the alternative “functionally active variant thereof” given in Claim 1 because every previously known T-cell epitope is encompassed by this expression. However, even in the absence of this alternative the present claims are not novel because **all** of the X-documents cited in the international search report anticipate the novelty of the present claims since some of the claimed T-cell epitopes in these documents are disclosed in them (see e.g. Journal of General Virology (1999), 80, 399-408, p. 401, “Synthetic Peptides” section (1)). Accordingly the present claims do not meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The order of preferences in Claim 7 should be reviewed (first “at least 50” and finally “at least 9-13”?!).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The “and/or” alternatives in Claims 1, 8, 12, 13, 25, 26 and 27 render the scope of protection unclear.
2. The scope of Claim 3 is unclear (“structural homology”).
3. Claim 25 relates to a subject matter that in the opinion of this authority comes within the meaning of PCT Rule 67.1(iv). Therefore no opinion on the industrial applicability of the subject matter of this claim has been established (PCT Article 34(4)(a)(i)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 11 SEP 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T6



| | | |
|--|--|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29314PCT | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05006 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/05/2000 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 01/06/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/025 | | |
| Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT et al. | | |

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags 31/10/2000 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 07.09.2001 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter SCHEFFZYK, I Tel. Nr. +49 89 2399 8602  |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-42 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-27 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

50-78, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☐ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☐ alle Teile.
- ☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 1-27 beziehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | |
| | Nein: Ansprüche | 1-27 |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | |
| | Nein: Ansprüche | 1-27 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1-24,26,27 |
| | Nein: Ansprüche | 25: siehe Sektion VIII |

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEKTION IV-----

Das gemeinsame erfinderische Konzept, welches der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegt, kann in der Bereitstellung von Papillomavirus T-Zell Epitopen gesehen werden. Da solche Epitope jedoch bereits im Stand der Technik beschrieben sind (siehe die im internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente) ist dieses gemeinsame Konzept hinfällig. Jedes beanspruchte Peptid stellt somit eine separate Erfindung dar (Regel 13.1-13.3 PCT).

SEKTION V-----

Aufgrund der in Anspruch 1 genannten Alternative "funktionell aktive Variante davon" kann Neuheit vorliegender Ansprüche nicht anerkannt werden, denn jedes bisher bekannte T-Zell-Epitop wird von diesem Begriff umfasst. Jedoch, selbst in Abwesenheit dieser Alternative sind vorliegende Ansprüche nicht neu, denn **all** im internationalen Recherchenbericht zitierten X-Dokumente nehmen die Neuheit vorliegender Ansprüche vorweg, da einige der beanspruchten T-Zell Epitope in diesen Dokumenten offenbart werden (siehe **z.B.** Journal of General Virology (1999), 80, 399-408, Seite 401, Abschnitt "Synthetic Peptides" (1)). Demnach erfüllen vorliegende Ansprüche nicht das Erfordernis der Art. 33(2)(3) PCT.

SEKTION VII-----

Die Reihenfolge der Präferenzen sollte in Anspruch 7 überprüft werden (an erster Stelle mindestens 50- an letzter Stelle mindestens 9-13?!)

SEKTION VIII-----

- 1). Die "und/oder" Alternativen in den Ansprüchen 1, 8, 12, 13, 25, 26 und 27 machen den Schutzzumfang dieser Ansprüche unklar.
- 2). Der Schutzzumfang des Anspruchs 3 ist unklar ("strukturelle Homologie").

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 3). Der Anspruch 25 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|---|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29314PCT | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/05006 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/05/2000 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/06/1999 |
| Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/025

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie ^o | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|--|--------------------|
| X | WO 95 01374 A (BRITISH TECH GROUP ; SHEPHERD PHILIP STEPHEN (GB)) 12. Januar 1995 (1995-01-12) Zusammenfassung; Ansprüche | 1-27 |
| X | DE GRUIJL, TANJA D. ET AL.: "IMMUNE RESPONSES AGAINST HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) TYPE 16 VIRUS-LIKE PARTICLES IN A COHORT STUDY OF WOMEN WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA I DIFFERENTIAL T-HELPER AND IGG RESPONSES IN RELATION TO HPV INFECTION AND DISEASE OUTCOME" J GEN VIROL (1999) 80(2) 399-408, XP002149975 Zusammenfassung Seite 401 | 1-27 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Oktober 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/10/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cervigni, S

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | WO 96 33737 A (EURO DIAGNOSTICA AB ;DILLNER JOAKIM (SE)) 31. Oktober 1996 (1996-10-31) Seite 19; Tabelle 1A Ansprüche ---- | 1-27 |
| X | HEINO, P. ET AL.: "HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 CAPSIDS EXPOSE MULTIPLE TYPE-RESTRICTED AND TYPE-COMMON ANTIGENIC EPITOPES" J GEN VIROL (1995) 76(5) 1141-53, XP002149976 Tabelle 1 ---- | 1-27 |
| X | ZHOU J ET AL: "DEFINITION OF LINEAR ANTIGENIC REGIONS OF THE HPV16L1 CAPSID PROTEIN USING SYNTHETIC VIRION-LIKE PARTICLES" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, Bd. 189, Nr. 2, 1992, Seiten 592-599, XP000882827 ISSN: 0042-6822 Tabelle 1 ---- | 1-27 |
| X | TSUKUI, TAKU ET AL.: "INTERLEUKIN 2 PRODUCTION IN VITRO BY PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN RESPONSE TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS-DERIVED PEPTIDES CORRELATION WITH CERVICAL PATHOLOGY" CANCER RES (1996) 56(17) 3967-3974, XP002149977 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---- | 1-27 |
| X | WO 92 10513 A (UNIV QUEENSLAND ;CSL LTD (AU)) 25. Juni 1992 (1992-06-25) Zusammenfassung; Ansprüche ---- | 1-27 |
| X | WO 92 05248 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 2. April 1992 (1992-04-02) Seite 21; Ansprüche 41,42 Zusammenfassung ---- | 1-27 |
| X | EP 0 451 550 A (BEHRINGWERKE AG) 16. Oktober 1991 (1991-10-16) Zusammenfassung; Ansprüche ---- | 1-27 |
| X | WO 98 05790 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;GISSMANN LUTZ (DE); JOCHMUS INGRID (DE); KL) 12. Februar 1998 (1998-02-12) das ganze Dokument ---- | 1-27 |
| X | WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15. April 1999 (1999-04-15) das ganze Dokument ----- | 1-27 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/05006

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9501374 A | 12-01-1995 | AU 7040594 A CA 2166333 A EP 0706533 A GB 2279651 A JP 8512045 T NZ 267682 A | 24-01-1995 12-01-1995 17-04-1996 11-01-1995 17-12-1996 28-10-1996 |
| WO 9633737 A | 31-10-1996 | AU 5520796 A EP 0824359 A US 5989548 A | 18-11-1996 25-02-1998 23-11-1999 |
| WO 9210513 A | 25-06-1992 | AT 189818 T AU 660954 B AU 9070991 A CA 2097916 A DE 69131992 D DE 69131992 T EP 0561885 A JP 6503559 T | 15-03-2000 13-07-1995 08-07-1992 13-06-1992 23-03-2000 29-06-2000 29-09-1993 21-04-1994 |
| WO 9205248 A | 02-04-1992 | AU 8762991 A CN 1067382 A | 15-04-1992 30-12-1992 |
| EP 0451550 A | 16-10-1991 | AU 650868 B AU 7351591 A CA 2038581 A JP 4217998 A PT 97073 A | 07-07-1994 26-09-1991 21-09-1991 07-08-1992 31-10-1991 |
| WO 9805790 A | 12-02-1998 | DE 19631357 A EP 0917586 A | 05-02-1998 26-05-1999 |
| WO 9918220 A | 15-04-1999 | AU 9684698 A EP 1021547 A NO 20001768 A | 27-04-1999 26-07-2000 02-06-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/73335 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: **C07K 14/025**

(DE). NIELAND, John [NL/DE]; Englestrasse 4, 81477 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/05006**

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Mai 2000 (31.05.2000)

(74) Anwalt: **BÖSL, Raphael**; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileipl. 1, 81679 München (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 25 199.1 1. Juni 1999 (01.06.1999) DE

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, 82152 Planegg/Martinsried (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JOCHMUS, Ingrid** [DE/DE]; Freilandstrasse 15a, 82194 Gröbenzell

(54) Title: CYTOTOXIC T-CELL EPITOPES OF THE PAPILLOMA VIRUS L1-PROTEIN AND USE THEREOF IN DIAGNOSIS AND THERAPY

(54) Bezeichnung: ZYTOTOXISCHE T-ZELLEPITOPE DES PAPILLOMAVIRUS L1-PROTEINS UND IHRE VERWENDUNG IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to a papilloma virus T-cell epitope with an amino acid sequence ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETDTLYCY, QAEPDRAHYN, SMVTSDAQI, and/or a functionally active variant thereof. The invention also relates to the use thereof in diagnosis and therapy.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETDTLYCY, QAEPDRAHYN, SMVTSDAQI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

WO 00/73335 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus L1-Proteins und ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, 10 NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLICY, QAEPDRAHYN, SMVTSDAQI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

15 Die Papillomviren, auch Warzenviren genannt, sind doppelsträngige DNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 8000 Basenpaaren und einem Ikosaederförmigen Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 55 nm. Bis heute sind mehr als 100 verschiedene humanpathogene Papillomavirustypen (HPV) bekannt, von denen einige, z.B. HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 20 oder HPV-58, bösartige Tumore und andere, z.B. HPV-6, HPV-11 oder HPV-42 gutartige Tumore verursachen können.

Das Genom der Papillomaviren läßt sich in drei Bereiche unterteilen: Der erste Bereich betrifft eine nicht-kodierende Region, die Regulationselemente für die 25 Transkription und Replikation des Virus enthält. Die zweite Region, sogenannte E-(Early)Region enthält verschiedene Protein-kodierende Abschnitte E1-E7, von denen z.B. das E6- und das E7-Protein für die Transformation von Epithelzellen verantwortlich sind und das E1-Protein die DNA-Kopienzahl kontrolliert. Bei der E6- und E7-Region handelt es sich um sogenannte Onkogene, die auch in bösartig

entarteten Zellen exprimiert werden. Die dritte Region, auch L-(Late)Region genannt, enthält zwei Protein-kodierende Abschnitte L1 und L2, die für Strukturkomponenten des Viruskapsids kodieren. Das L1-Protein ist zu über 90% im viralen Kapsid vorhanden, wobei das Verhältnis von L1:L2 im allgemeinen 30:1 ist.

5 Unter dem Begriff L1-Protein versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung das Hauptkapsid Protein der Papillomaviren (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445).

In über 50% der Fälle wird HPV-16 mit Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom)

10 in Verbindung gebracht. HPV-16 ist der Hauptrisikofaktor für die Ausbildung von cervicalen Neoplasien. Das Immunsystem spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der Krankheit. So sind vermutlich zelluläre Immunantworten und insbesondere Antigen-spezifische T-Lymphozyten wichtig für den Abwehrmechanismus. Es wurde weiterhin gefunden, daß in hochgradig malignen cervicalen intra-

15 epithelialen Neoplasien (CIN II/III) und cervicalen Tumoren das E7-Gen konstitutiv in allen Schichten des infizierten Epithels exprimiert wird. Daher wird vor allem das E7-Protein als potentiellies Tumorantigen und als Zielmolekül für aktivierte T-Zellen betrachtet (siehe z.B. WO 93/20844). Die E7-induzierte zelluläre Immunantwort im Patienten ist aber anscheinend nicht stark genug, um den

20 Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Die Immunantwort kann eventuell durch geeignete Impfstoffe verstärkt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des L1-Gens bzw. die Coexpression des L1- und L2-Gens zur Bildung von Capsomeren, stabilen Capsomeren,

25 Capsiden oder Virus-ähnliche Partikel (VLPs für virus-like particle) führen kann (siehe z.B. WO 93/02184, WO 94/20137 oder WO 94/05792). Unter Capsomeren versteht man eine oligomere Konfiguration, die aus fünf L1-Proteinen aufgebaut ist. Das Capsomer ist der Grundbaustein, aus denen virale Capside aufgebaut sind. Unter stabilen Capsomeren versteht man Capsomere, die nicht dazu in der Lage

30 sind sich zu Capsiden zusammenzusetzen. Unter Capsiden versteht man die Hülle

des Papillomavirus, die beispielsweise aus 72 Capsomeren zusammengesetzt ist (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445). Unter VLP versteht man ein Capsid, das morphologisch und in seiner Antigenität einem intakten Virus gleicht. Die VLPs konnten zur Auslösung einer humoralen Immunantwort, die durch Bildung von neutralisierenden Antikörpern charakterisiert ist, in verschiedenen tierischen Systemen verwendet werden. Die Bildung von virus-neutralisierenden Antikörpern gegen L1- und/oder L2-Protein ist jedoch von geringerer klinischer Bedeutung, wenn die Virusinfektion bereits stattgefunden hat, da für die Eliminierung virus-infizierter Zellen keine Antikörper, sondern eine virus-spezifische zytotoxische T-Zell-(CTL)-Antwort notwendig zu sein scheint. Und obwohl VLPs in der Lage sind eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen, scheint eine ausschließlich gegen die Kapsidproteine L1 und/oder L2 gerichtete Immunantwort nicht zur Bekämpfung eines durch Papillomaviren bedingten Tumors geeignet.

Es wurden daher sogenannte chimäre Papillomavirus-ähnliche Partikel (CVLPs für chimeric virus-like particle) entwickelt, die aus einem Fusionsprotein des Kapsidproteins L1 und des potentiellen Tumorantigen E7 bestehen (WO 96/11272 und Müller, M. et al. (1997) Virology, 234, 93). Die CVLPs lösten nur im geringen Maße eine gegen das E7-Protein gerichtete humorale Immunantwort aus (Müller, M. et al. (1997), supra). Einige der getesteten CVLPs induzieren jedoch tatsächlich die erwünschte E7-spezifische zytotoxische T-Zellantwort in Mäusen (siehe auch Peng S. et al. (1998) Virology 240,147-57). CVLPs sind deshalb sowohl für die Entwicklung eines Impfstoffes als auch für die Behandlung bereits bestehender Infektionen und daraus resultierender Tumore interessant, da die über MHC-Moleküle der Klasse I-präsentierten E7-Peptide von Tumorzellen Zielmoleküle von zytotoxischen T-Zellen darstellen würden.

Einem Impfstoff bestehend aus CVLPs liegt das Prinzip der Pseudoinfektion der Zellen durch die CVLPs zugrunde. Dies bedeutet, daß die CVLPs wie Viren in die Zelle gelangen, dort zu Peptiden prozessiert werden, die Peptide dann auf MHC-

Klasse I und II-Moleküle geladen werden und letztendlich CD8- bzw. CD4-positiven T-Zellen präsentiert werden. CD8-Zellen können als Folge dieser Stimulation zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und dann eine zelluläre Immunantwort bewirken, CD4-Zellen hingegen entwickeln sich zu T-Helferzellen und stimulieren B-Zellen zu einer humoralen oder CD8-positive T-Zellen zu einer zytotoxischen Immunantwort und können selbst die Lyse von infizierten Zellen induzieren.

Kleine Peptide können bereits auf der Zelloberfläche an MHC-Klasse I-Moleküle binden und dann ohne weitere Prozessierung CD8- oder CD4-positive Zellen zu einer zellulären Immunantwort stimulieren. Ein bestimmtes Peptid kann jedoch nur durch bestimmte MHC-Moleküle gebunden werden. Durch den großen Polymorphismus der MHC-Moleküle in natürlichen Populationen kann deshalb ein bestimmtes Peptid lediglich durch einen kleinen Teil einer Population gebunden und präsentiert werden. Unter Präsentation im Sinne der vorliegenden Erfindung wird verstanden, wenn ein Peptid oder Proteinfragment an ein MHC-Molekül bindet, wobei diese Bindung beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum, im extrazellulären Raum, den Endosomen, Proendosomen, Lysosomen oder Protysosomen, stattfinden kann, und wenn dann dieser MHC-Molekül-Peptid-Komplex auf der extrazellulären Seite der Zellmembran gebunden ist, so daß er durch Immunzellen spezifisch erkannt werden kann.

Da CVLPs sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort auslösen und nicht MHC-restringiert sind, eignet sich diese Technologie generell zur Entwicklung von Impfstoffen, indem die Fähigkeit zur Partikelbildung durch einen L1-Anteil zur Verfügung gestellt wird und ein zusätzlicher Antigenanteil an diesen L1-Anteil fusioniert wird.

Bei der Entwicklung derartiger CVLPs ist es unbedingt notwendig, ein funktionelles Testsystem zur Verfügung zu haben, mit dem man direkt die Immunogenität von CVLPs untersuchen kann. Ein derartiges Testsystem sollte die Eigenschaft besitzen, daß CVLPs mit unterschiedlichen Antigenanteilen mit demselben Testsystem untersucht werden können. Da für immunologische Therapieverfahren von Tumoren oder Viruserkrankungen die zelluläre Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, stellte sich die Aufgabe, die durch CVLPs hervorgerufene zelluläre Immunantwort meßbar zu machen.

Die Lösung dieser Aufgabe gelang durch die Identifikation von T-Zell-Epitopen, die in Verbindung mit MHC-Molekülen, in einer besonderen Ausführungsform mit HLA A2.01 MHC-Molekülen in vivo und in vitro beispielsweise eine zytotoxische T-Zellantwort auslösen. Diese Peptide haben vorzugsweise die Sequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETDLGYCY, QAEPDRAHYN, SMVTSDAQL. Diese Sequenzen sind Bestandteil des L1- und des E7-Peptid des HPV16. Sie umfassen die Aminosäurebereiche L1 86-94 (5104), L1 123-131 (5106), L1 285-293 (5107), L1 275-283 (5108), L1 238-246 (5109), L1 426-434 (5112), L1 28-39 (2016), L1 311-320 (2017), L1 408-417 (2018), L1 38-47 (2019), L1 396-404 (2020), L1 349-357 (2022), L1 298-306 (27/28), L1 90-98 (9), E7 1-9 (43), E7 18-25 (45) und E7 44-53 (47/48). Die Namen der jeweiligen Epitope ist in Klammern angegeben.

Die E7-Peptide 43, 45 und 47/48 wurden als potentielle Epitope bereits in Kast et al., (1994) Journal of Immunology 152, 3904-3912 publiziert. Allerdings wird in dieser Publikation lediglich gezeigt, daß diese Peptide an HLA A1 Moleküle binden können, jedoch nicht, daß tatsächlich ein zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst werden kann. Des weiteren sind keine Daten aufgeführt, die dokumentieren, daß die Peptide als Bestandteil eines Proteins durch T-Zellen erkannt werden. Es

wurde nämlich vielfach gezeigt, daß Peptide, die per se an HLA-Moleküle binden, nicht notwendigerweise auch durch T-Zellen erkannt werden. Des weiteren ist bekannt, daß T-Zellen, die zwar ein Peptid erkennen, meßbar dadurch daß sie sich durch das Peptid zu einer T-Zellantwort induzieren lassen, nicht notwendigerweise auch Zellen erkennen, die mit ganzen Proteinen – enthaltend das entsprechende Peptid – beladen wurden. Dies ist dadurch zu erklären, daß oft Peptide Protease-schnittstellen enthalten, innerhalb derer die Peptide während der Prozessierung der ganzen Proteine in der Zelle geschnitten und somit zerstört werden und somit nicht mehr durch T-Zellen erkannt werden können. Diese Problematik wird beispielsweise in Feltkamp et al. (1993), Eur. J. Immunol. 23: 2242-2249 bestätigt.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLYCY, QAEPDRAHYN, SMVTSDAQI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.

Unter einer funktionell aktiven Variante von ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLYCY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI versteht man ein T-Zell-Epitop, das in einem T-Zell-Zytotoxizitäts-Testsystem (siehe beispielsweise Beispiele 2-5 der vorliegenden Erfindung) eine, an der Zytotoxizität von ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLYCY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI gemessene Zytotoxizität besitzt, die mindestens der Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrollen und der dreifachen

Standardabweichung entspricht, vorzugsweise von mindestens ca. 30%, insbesondere mindestens ca. 50% und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 80%.

- 5 Eine bevorzugte Variante ist beispielsweise ein T-Zell-Epitop mit einer Sequenzhomologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETDLICY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene. Andere bevorzugte Varianten sind auch T-Zell-Epitope, die eine strukturelle Homologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, 15 YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETDLICY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI haben. Solche Epitope können aufgefunden werden, indem man gegen die T-Zell-Epitope ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, 20 YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETDLICY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI spezifische T-Zellen generiert (DeBruijn M.L. et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21, 2963-70; und DeBruijn M.L. (1992) Eur. J. Immunol. 22, 3013-20) und beispielsweise synthetisch hergestellte Peptide nach Wahl auf Erkennung durch die peptidspezifischen T-Zellen getestet werden (siehe 25 Beispiele). Insbesondere werden unter T-Zellepitopen zytotoxische T-Zellepitope verstanden. Es sind jedoch auch nicht zytotoxische T-Zellen bekannt, die ebenfalls MHC I-Moleküle erkennen können, so daß auch nicht-zytotoxische T-Zellepitope als Variante von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein T-Zell-Epitop, das Teil einer Verbindung ist, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist.

In einer besonderen Ausführungsform kann ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, und/oder eine funktionell aktive Variante in einem L1-Protein eines anderen Papillomavirus oder in einem chimären L1-Protein, beispielsweise einem HPV18L1E7-Fusionsprotein, enthalten sein. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

15

Vorzugsweise kann das genannte T-Zell-Epitop als Teil einer Verbindung ein Polypeptid, das in bevorzugter Weise weitere Aminosäuresequenzen enthält, insbesondere ein Fusionsprotein sein. Insbesondere kann die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9-12 Aminosäuren Länge sein.

Um die Verbindung zu detektieren oder in ihrer Aktivität der Bindung an T-Zellen zu modifizieren, kann sie eine chemische, radioaktive Isotopen-, nicht radioaktive Isotopen-, und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins enthalten.

Beispiele von dem Fachmann bekannten chemischen Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße chemische Markierung eignen, sind: Biotin, FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder Streptavidin.

- 5 Eine mögliche Ausführungsform ist, daß ein Peptid derart modifiziert wird, daß es mindestens ein Lysin enthält. An dieses Lysin wird in der dem Fachmann bekannter Weise Biotin oder FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt. Ein derartig modifiziertes Peptid wird an ein entsprechendes MHC-Molekül oder an eine Zelle mit entsprechenden MHC-Molekülen gebunden. Daraufhin kann das Peptid
10 über markiertes Avidin oder Streptavidin bzw. direkt über die Fluoreszenz des FITC nachgewiesen werden.

- Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P oder
15 ^{14}C .

Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße nicht radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^2H oder ^{13}C .

- 20 Beispiele von dem Fachmann bekannten fluoreszierenden Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße Fluoreszenzmarkierung eignen, sind: ^{152}Eu , Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phtaldehyd oder Fluorescamin.
- 25 Dem Fachmann sind weitere hier nicht aufgeführte Markierung bekannt, die auch im Sinne dieser Erfindung zur Markierung eingesetzt werden können.

Beispiele von dem Fachmann bekannten erfindungsgemäßen chemischen Modifikationen sind die Übertragung von Acetyl-, Phosphat-, und/oder Monosacharidgruppen

- 5 Erfindungsgemäße Polypeptide mit einer Aminosäurelänge von ca. 50 können beispielsweise durch eine chemische Peptidsynthese hergestellt werden. Längere Polypeptide werden vorzugsweise gentechnisch erzeugt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression des genannten T-Zell-Epitops oder der Verbindungen, das folgende Komponenten
- 10 enthält: (a) mindestens ein regulatorisches Element und (b) mindestens eine Nukleinsäure, die für eine Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindung kodiert. Das genannte Nukleinsäurekonstrukt ist vorzugsweise aus DNA oder RNA. Geeignete regulatorische Elemente erlauben beispielsweise die konstitutive, regulierbare, gewebspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische
- 15 Expression in eukaryotischen Zellen oder die konstitutive, metabolischspezifische oder regulierbare Expression in prokaryotischen Zellen. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer, und/oder Repressorsequenzen.
- 20 Beispiele für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, wie CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor und virale Promotor-und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV HTLV oder HIV.

25

Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryoten ermöglichen sind der Tetrazyklinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die gewebsspezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden.

5

Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind die Promotoren der folgenden Gene: cdc25C, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker J. und Müller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6).

10

Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolisch spezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glucosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

15 Um die Einführung der genannten Nukleinsäure und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen, oder nicht viralen Vektors vorliegen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Vektor, insbesondere ein Expressions-
20 vektor, der eine Nukleinsäure codierend für ein erfindungsgemäßes Polypeptid enthält. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Baculoviren, Vakziavi-
niaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder Poly-Lysin konjugierte DNA.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mindestens ein T-Zell-Epitop enthält, vorzugsweise präsentiert. In einer besonderen Ausführungsform wird die Zelle durch einen der genannten Vektoren transfiziert,

transformiert oder infiziert. Diese Zelle exprimiert unter dem Fachmann bekannten Bedingungen, die zur Aktivierung der jeweils verwendeten regulierbaren Elemente führen, das erfindungsgemäße Polypeptid. Das Polypeptid kann dann aus dieser Zelle isoliert und z.B. unter Verwendung einer der oben genannten Markierungen aufgereinigt werden. Zur gentechnischen Herstellung und anschließenden Aufreinigung der exprimierten, erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich prokaryotische und eukaryotische Zellen, insbesondere Bakterienzellen wie beispielsweise E. coli, Hefezellen wie beispielsweise S. cerevisiae, Insekten Zellen wie beispielsweise Spodoptera frugiperda Zellen (Sf-9) oder Trichoplusia ni Zellen oder Säugerzellen wie beispielsweise COS-Zellen oder HeLa-Zellen.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist es, die Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptide exprimiert, selbst zu verwenden, wobei in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die Zelle Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids über MHC-1 Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Für die Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle sind Antigen-präsentierende Zellen wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Fibroblasten oder anderen HLA A2.01 positive Zellen, in einer bevorzugten Ausführungsform JY-, T2, CaSki-Zellen oder EBV-transformierte B-Zelllinien, geeignet. Die erfindungsgemäßen Zellen, die ein Polypeptid enthaltend ein T-Zell-Epitop, präsentieren, können als Zielzellen zur Restimulation von Immunzellen, insbesondere T-Zellen und/oder zur Messung der Aktivierung von T-Zellen eingesetzt werden. Unter Zielzelle im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle zu verstehen, die über MHC-Moleküle ein T-Zell-Epitope präsentiert und damit spezifisch eine T-Zell-Aktivierung hervorruft, insbesondere eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen die Zelle.

Ferner kann die ein T-Zell-Epitop enthaltene Verbindung, Teil eines Komplexes sein, der dadurch charakterisiert ist, daß die Verbindung kovalent oder über hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindung oder Wasserstoffbrückenbindungen

mit mindestens einer weiteren Spezies wie Peptide, Proteine, Peptoide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysacharide und Nukleinsäuren verbunden ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung und mindestens eine weitere Verbindung. Eine bevorzugte Ausführungsform ist, daß das Polypeptid in Verbindung mit MHC Klasse I-Molekülen, vorzugsweise als HLA A2.01 Tetramer vorliegt. Besonders bevorzugt sind humane MHC-Klasse I Moleküle. Durch die Technik von Altman J.D. et al. (1996, Science 274, 94-6) lassen sich beispielsweise HLA A2.01-Tetramere mit den entsprechenden gebundenen Peptiden herstellen, die in der Lage sind, an die T-Zellrezeptoren von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen zu binden.

Eine weitere Ausführungsform ist die Immobilisierung der erfindungsgemäßen Verbindung oder des genannten Komplexes an Trägermaterialien. Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose oder Gerüstproteine.

20

Zur Aufreinigung des erfindungsgemäßen Komplexes kann eine Komponente des Komplexes zusätzlich noch ein Protein-Tag enthalten. Erfindungsgemäße Protein-Tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern ohne den Komplex im nennenswerten Maße zu eluieren und anschließende gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele von dem Fachmann bekannten Protein-Tags, sind ein (HIS)₆-Tag, ein Myc-Tag, ein FLAG-Tag, ein Hämagglutinin-Tag, Glutathion-Transferase (GST)-Tag, Intein mit einem Affinitäts- Chitin-binding Tag oder Maltose binding protein

25

(MBP)-Tag. Die erfindungsgemäßen Protein-Tags können sich N-, C-terminal, und/oder intern befinden.

- 5 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop. Ein derartiges Verfahren besteht vorzugsweise aus drei Schritten:
- 10 a) In einem ersten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Verbindungen enthaltend ein T-Zell-Epitop stimuliert. Diese Verbindung kann mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens ein Capsomer, mindestens ein stabiles Capsomer, mindestens ein VLP, mindestens ein CVLP, und/oder mindestens ein Virus
- 15 bedeuten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Immunzellen durch die Inkubation mit CVLPs stimuliert. Diese Stimulation kann beispielsweise in Form einer Impfung erfolgen, oder durch Inkubation von Immunzellen mit CVLPs in vitro. Derartig stimulierte Immunzellen werden beispielsweise nach einer Impfung oder bei einem Tumorpatienten aus dem Blut, aus Tumoren oder aus Lymphknoten gewonnen, und/oder werden
- 20 kultiviert.
- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-
- 25 Epitop präsentiert und/oder mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex inkubiert.
- c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expres-

sion von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ^{51}Cr -Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen, die erfindungsgemäße Markierungen enthalten, erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ^{51}Cr -Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a) eingeführt wird.

- a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a) nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 8 Wochen, insbesondere für mindestens ca. 1 Woche cokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Cokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

- (i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert,

im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbedeälter zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer T-Zell-Epitop präsentierenden Zielzelle. Hierbei ist es möglich, die

Zielzelle mit Kombinationen von unterschiedlichen T-Zell-Epitopen zu beladen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit mindestens einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop und/oder mindestens einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop inkubiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle in Wachstumsmedium, das erfindungsgemäße Polypeptide enthält, oder mit MHC Klasse I-Komplexen mit gebundenen erfindungsgemäßen Polypeptiden inkubiert. Die MHC Klasse I-Komplexe können beispielsweise als HLA A2.01-Tetramere vorliegen. Ein Tetramer bindet dabei in der Regel vier Peptide. Diese können sowohl identisch sein oder aber unterschiedliche Spezies von Peptiden repräsentieren. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit einer Nukleinsäure und/oder einem Vektor transfiziert, transformiert und/oder infiziert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit einem Vakziniavirusvektor infiziert. Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit Antigen-präsentierenden Zellen beispielsweise mit B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, embryonalen Zellen oder Fibroblasten oder anderen HLA A2.01 positiven Zellen, in einer bevorzugten Ausführungsform mit JY-, T2-, CaSki- Zellen oder EBV-transformierten B-Zelllinien durchgeführt.

Die verwendeten CVLPs enthalten ein Papillomavirus L1-Protein oder Varianten davon, insbesondere HPV16 L1-Protein und, jedoch nicht notwendigerweise, ein zu L1 heterologes Protein oder Varianten davon. Die zwei Proteine können direkt oder indirekt gebunden vorliegen. Direkt gebunden meint im Sinne der Erfindung, daß eine kovalente Bindung zwischen den beiden Proteinen vorliegt, beispielsweise eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung. Indirekt gebunden bedeutet, daß die Proteine über nicht-kovalente Bindungen gebunden sind, beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindungen oder Wasserstoffbrücken. In einer weiteren Ausführungsform enthalten die CVLPs zusätzlich zu L1-Protein oder Varianten davon ein Papillomavirus L2-Protein.

Eine bevorzugte Ausführung des L1-Proteins der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise L1-Proteine mit einer oder mehreren Deletionen, insbesondere einer C-terminalen Deletion. Eine C-terminale Deletion hat den Vorteil, daß die Effizienz der Bildung virus-ähnlicher Partikel gesteigert werden kann, da das am C-Terminus lokalisierte nukleäre Lokalisationssignal deletiert wird. Die C-terminale Deletion beträgt daher vorzugsweise bis zu ca. 35 Aminosäuren, insbesondere ca. 25 bis ca. 35 Aminosäuren, vor allem ca. 32 bis ca. 34 Aminosäuren. Beispielsweise ist eine 32 Aminosäuren lange C-terminale Deletion des HPV16 L1-Proteins ausreichend, um die Bildung von virus-ähnlichen Partikeln um das mindestens ca. zehnfache steigern zu können. Des weiteren kann das L1-Protein eine oder mehrere Mutationen tragen oder der L1-Anteil aus L1-Proteinen verschiedener Papillomaviren zusammengesetzt sein. Gemeinsames Kennzeichen der erfindungsgemäßen L1-Proteine ist, daß sie die Bildung von VLPs bzw. CVLPs zulassen und daß sie mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthalten.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das L1-Protein oder Varianten davon und das zu L1 heterologe Protein ein Fusionsprotein. Beinhaltet sind auch heterologe Proteine, die aus mehreren verschiedenen Proteinen oder Teilen davon zusammengesetzt sind. Dies können beispielsweise auch Epitope, insbesondere zytotoxische T-Zellepitope von Proteinen sein. Epitope im Sinne der Erfindung können dabei auch Teil eines synthetischen Polypeptids mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9 Aminosäuren sein.

25

Bevorzugt sind zu L1 heterologe Proteine, die von einem viralen Protein abgeleitet sind, beispielsweise abgeleitet von HIV, HBV oder HCV, vorzugsweise von Papillomaviren, insbesondere von humanen Papillomaviren.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein E-Protein eines Papillomavirus, vorzugsweise ein E6- und/oder E7-Protein. Insbesondere ist bevorzugt, wenn das E-Protein ein deletiertes E-Protein ist, vorzugsweise ein C-terminal deletiertes, insbesondere ein C-terminal deletiertes E7-Protein, da diese Konstrukte in
5 Verbindung mit deletiertem L1-Protein bevorzugt virus-ähnliche Partikel ausbilden können. Insbesondere bevorzugt sind Deletionen bis zu 55 Aminosäuren, vorzugsweise ca. 5 bis ca. 55 Aminosäuren, insbesondere ca. 38 bis ca. 55 Aminosäuren.

10 In einer weiteren Ausführung kann das zu L1 heterologe Protein von Antigenen nicht viraler Erreger abstammen. Ebenso können sie von Autoimmunantigenen wie z.B. Thyroglobulin, Myelin basic protein oder Zona Pellucida Glycoprotein 3 (ZP₃), die mit bestimmten Autoimmunkrankheiten wie z.B. Thyroiditis, Multiple Sklerose, Oophoritis oder rheumatoider Arthritis assoziiert sind, abgeleitet sein. In
15 einer bevorzugten Ausführung stammt das zu L1 heterologe Protein von Tumorantigenen ab, vorzugsweise Melanomaantigenen wie MART, Ovarialcarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1 oder CA125, Colonicarcinomantigenen wie CA125 oder Mammacarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1, BCRA-2.

20

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen, die durch Präparation aus Proben gewonnen werden. Dieses Verfahren erlaubt es zu bestimmen, ob in einer Probe, beispielsweise einer Blutprobe eines Patienten oder in Tumoren oder Lymphknoten eines
25 Tumorpatienten, Papillomavirus L1-Protein-spezifische zytotoxische T-Zellen vorhanden sind. Ein derartiges Nachweisverfahren enthält die folgenden Schritte:

a“) In einem ersten Schritt werden Zellen gewonnen, beispielsweise durch Blutabnahme von einem Patienten oder durch die Präparation zum Beispiel

von Tumoren oder Lymphknoten. Anschließend werden die Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und kultiviert.

- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert oder mit mindestens einem Komplex, der als eine Komponente eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitope umfaßt, inkubiert.
- 5
- c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ^{51}Cr -Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen die erfindungsgemäße Markierungen enthalten erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cyto-
5 kinassay, Elispot, ⁵¹Cr-Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a'') eingeführt wird.

a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a'') nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-
15 Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein
20 T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 8 Wochen, insbesondere für mindestens ca. 1 Woche kokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Kokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

(i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, min-
25 destens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,

- 22 -

- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert,

5 im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbedälter zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testsystem (Kit) zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:

- 10 a) mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop, mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex, und
- b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere
15 zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

Das Testsystem wird in einer besonderen Ausführungsform zur Bestimmung der, beispielsweise in einer Blutprobe eines Patienten oder in Tumoren oder Lymphknoten eines Tumorpatienten vorhandenen L1-Protein-spezifischen zyto-
20 toxischen T-Zellen verwendet. In diesem Fall sind die in b) beschriebenen Zellen im Testsystem enthaltene Kontrollzellen, deren Aktivierung durch die erste Kitkomponente, die unter a) genannten Substanzen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit die T-Zell-Aktivierung von aus Patienten isolierten Zellen durch die Kitkomponente a) verglichen.

25

In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird das Testsystem beispielsweise zur Bestimmung der L1-Protein-spezifischen Antigenität einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines

Capsomers, eines stabilen Capsomers, eines VLPs, eines CVLPs, und/oder eines Virus verwendet. In diesem Fall sind die in a) beschriebenen Substanzen Kontrollsubstanzen deren aktivierende Wirkung auf die zweite Kitkomponente, die unter b) genannten Zellen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten
5 Aktivierung wird mit der aktivierenden Wirkung einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Capsomer, einem stabilen Capsomer, einem VLP, ein CVLP, und/oder einem Virus auf die Kitkomponente b) verglichen.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens einer erfindungsgemäßen Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop zur, und/oder
15 mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.

Zur Stimulation von Immunzellen in vitro wie in vivo eignen sich insbesondere Zellen, die mindestens eines der erfindungsgemäßen Moleküle über ihre MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren. Zur Antigen-Präsentation geeignete Zellen sind z.
20 B. B-Zellen, dendritische Zellen, Macrophagen, Fibroblasten oder andere HLA A2.01 positive Zellen, die durch eine gemeinsame Kultivierung mit Immunzellen eine Stimulation von spezifischen T-Zellen erreichen können.

- 25 In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, zur Detektion einer Immunantwort eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine
5 ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen-Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

10 Beispiele von dem Fachmann bekannten Trägern sind Glas, Polystyren, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon, Amylase, natürliche oder modifizierte Zellulose, Polyacrylamide, Agarose, Aluminiumhydroxid oder Magnitid.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Lösung vorlie-
15 gen, an eine feste Matrix gebunden sein, und/oder mit einem Adjuvans versetzt sein.

Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann auf verschiedene Weisen verabreicht werden. Beispiele von dem Fachmann bekannten Verabreichungsformen sind pa-
20 renterale, lokale und/oder systemische Applikation durch z. B. orale, intranasale, intravenöse, intramuskuläre, und/oder topische Applikation. Die bevorzugte Applikationsform wird beispielsweise durch den natürlichen Infektionsweg der jeweiligen Papillomavirusinfektion beeinflusst. Die verabreichte Menge richtet sich nach Alter, Gewicht, allgemeinem Gesundheitszustand des Patienten und dem
25 Typ der Papillomavirusinfektion. Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Form von Kapseln, Lösung, Suspension, Elixier (für orale Applikation) oder sterile Lösungen bzw. Suspensionen (für parenterale oder intranasale Applikation) verabreicht werden. Als inerte und immunologisch akzeptable Träger kann beispielsweise Salzlösung oder phosphatgepufferte Salzlösung verwendet werden.

Das Arzneimittel wird in therapeutisch effektiven Mengen verabreicht. Das bedeutet Mengen, die ausreichend sind, um eine schützende immunologische Antwort hervorzurufen.

- 5 In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, als Arzneimittel oder Diagnostikum eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

10

Die Figuren und die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

- Fig. 1 zeigt die graphische Auswertung der MTT-Färbung von WEHI-Zellysaten, gemessen als Absorption bei 595 nm, die mit Überständen von T-Zellen inkubiert worden waren, die wiederum durch unterschiedliche Antigen-präsentierende periphere Blutlymphozyten (PBL) stimuliert worden waren. Durch spezifische Antigen-präsentierende PBL stimulierte T-Zellen sekretieren $\text{TNF}\alpha$. Dieses induziert bei WEHI-Zellen Apoptose, so daß diese Zellen MTT nicht mehr zu einem bräunlichen Farbstoff prozessieren können. Niedrige Absorption bedeutet geringe Farbstoffproduktion und somit viele apoptotische Zellen, die somit viel $\text{TNF}\alpha$ ausgesetzt waren, so daß die zugehörigen T-Zellen stimuliert worden waren. Somit ist die Stimulation der T-Zellen umso besser, je niedriger die Absorption für ein bestimmtes Antigen bei 595 nm ist.

25

Fig. 2 zeigt die graphische Auswertung der Fluoreszenz von T2-Zellen – gemessen in einer FACS-Analyse –, deren auf der Zelloberfläche befindliche MHC-1 Moleküle durch einen FITC-markierten Antikörper markiert worden waren. Zel-

len, deren MHC-1 Moleküle spezifisch die auf der X-Achse aufgetragenen Peptide binden können, haben vermehrt MHC-1 Moleküle, da die spezifische Bindung die MHC-Komplexe stabilisiert, so daß sie sich auf der Zelloberfläche anreichern können.

5

Fig. 3 zeigt die Auswertung von drei FACScan-Experimenten nach Restimulation CVLP-spezifischer humaner T-Zellen mit peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC), die unterschiedliche Antigene präsentieren. Von links nach rechts ist jeweils der Gehalt an CD3 aufgetragen, das für T-Zellen spezifisch ist, und von unten nach oben der Gehalt an humanem Interferon γ , das für aktivierte Zellen spezifisch ist.

Fig. 4 zeigt die Auswertung von FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen eines HLA A1 positiven Spenders mit peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC), die unterschiedliche Antigene präsentieren. Von links nach rechts ist der Name des jeweiligen Peptids aufgetragen, mit denen die PBMC beladen wurden. „None“ steht für PBMC, die lediglich mit Puffer inkubiert wurden. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von Interferon γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 5 zeigt die Auswertung von FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Spenders mit peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC), die unterschiedliche Antigene präsentieren. Von links nach rechts ist der Name des jeweiligen Peptids aufgetragen, mit denen die PBMC beladen wurden. „None“ steht für PBMC, die lediglich mit Puffer inkubiert wurden. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von Interferon γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 6 zeigt die Auswertung von FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen eines HLA A1 positiven Spenders mit peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC), die unterschiedliche Antigene präsentieren. Von links nach rechts ist der Name des jeweiligen Peptidpools aufgetragen, mit denen die PBMC beladen wurden. „None“ steht für PBMC, die lediglich mit Puffer inkubiert wurden. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von Interferon γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

10 Fig. 7 zeigt die Auswertung von FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen eines HLA A24 positiven Spenders mit peripheren Blutmononukleären Zellen (BLCL), die unterschiedliche Antigene präsentieren. Von links nach rechts ist der Name des jeweiligen Peptidpools aufgetragen, mit denen die BLCL beladen wurden. „None“ steht für BLCL, die lediglich mit Puffer
15 inkubiert wurden. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von Interferon γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 8 zeigt die Auswertung eines ^{51}Cr -Freisetzungsexperiments nach Beladung
20 von BLCL-Zellen eines HLA A24 positiven Spenders (=Zielzellen) mit dem Peptid 9. Die Zielzellen wurden durch mit den Peptiden 1-43 stimulierte T-Zellen (=Effektorzellen) lysiert. Auf der X-Achse ist das Verhältnis der eingesetzten Effektorzellen zu den eingesetzten Zielzellen aufgetragen, auf der Y-Achse die % der spezifisch lysierten Zielzellen, bestimmt durch die Freisetzung von ^{51}Cr aus
25 den Zielzellen. Die %-Werte wurden nach der in Beispiel 7 angegebenen Formel berechnet.

Beispiele

1. Beschreibung der Ausgangsmaterialien

- Die Herstellung von HPV16 L1_{ΔC}-E7₁₋₅₅ CVLPs erfolgte gemäß der deutschen Patentanmeldung DE 198 12 941, siehe auch Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111.
5
- Die Herstellung von L1 VLP's erfolgte gemäß Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111.
- T2 Zellen, die unter der ATCC Nummer: CRL-1992 zu beziehen sind, weisen
10 einen Defekt im Antigenprozessierungs-assoziierten Transport auf, der zur Unterbindung der Beladung von MHC-1 Molekülen im endoplasmatischen Retikulum führt. Die dennoch auf der Zelloberfläche vorhandenen unbeladenen MHC-1 Moleküle können beispielsweise durch Inkubation der Zellen in Peptid-haltigen Medien beladen werden, so daß sich diese Zellen sehr gut zur
15 Präsentation eines Antigens eignen.
- WEHI Zellen sind unter der ATCC Nummer CRL-2148 zu beziehen.
- PMBC bedeutet periphere Blutmononukleäre Zellen, deren Isolierung wird beispielsweise in Rudolf M.P. et al. (1999), Biol. Chem. 380, 335-40 beschrieben.
- 20 • BLCL bedeutet eine mit Hilfe des Epstein-Barr-Virus transformierte B-Zelllinie (erhalten von Dr. Andreas Kaufmann, Friedrich-Schiller-University, Jena, Deutschland).
- BB7.2 bedeute ein α -HLA A2.01-spezifischer monoklonaler Maus Antikörper (ATCC HB-82).
- 25 • α -hum CD28 bedeutet ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanem CD28 gerichtet ist.

- α -hum CD3/PE bedeutet ein monoklonaler Maus Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanem CD3 (ϵ) gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Phycoerithrin enthält (Medac, Hamburg, Deutschland).
- α -hum CD4/Cychrome bedeutet ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanen CD4 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Cychrome enthält (DAKO; Glostrup, Dänemark).
- α -hum Interferon γ /FITC bedeutet einen monoklonaler Ratten-Antikörper, der gegen humanes Interferon γ gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker FITC enthält (Medac, Hamburg, Deutschland).
- α -hum CD8/PE bedeutet einen monoklonalen Maus-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanem CD8 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Phycoerithrin enthält (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).
- InfluenzaMP bedeutet Aminosäuren 58-66 GILGFVFTL des Influenza Matrix Protein (siehe Dunbar P.R. et al. (1998) Curr. Biol. 26, 413-6).
- HPV16E7-Peptid bedeutet Aminosäuren 11-20 YMLDLQPETT des humanen Papillomavirus E7-Proteins.
- Anhand des Algorithmus für potentielle HLA A2.01-bindende Peptide (Parker, KC et al. (1994) J. Immunol. 152:163), durchgeführt in dem Peptid-Prediction Program von Parker unter http://www.bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html wurden die folgenden Peptide als Kandidaten für HPV16 L1 identifiziert und synthetisch hergestellt. Die angegebenen Aminosäurepositionen des jeweiligen Peptids sind relativ zum Met (+1) der unter Genbank Zugangsnummer k02718 hinterlegten Sequenz für L1 angegeben (siehe nachfolgende Tabelle 1).

- 30 -

Tabelle 1: Potentielle HLA A2.01-bindende Peptide von HPV16 L1

| | Peptid Name | Sequenz | rel. L1-Position |
|----|-------------|--------------|------------------|
| | 5104 | ILVPKVSGL | (86-94) |
| 5 | 5105 | SMDYKQTQL | (174-182) |
| | 5106 | RLVWACVGV | (123-131) |
| | 5107 | HLFNRAGTV | (285-293) |
| | 5108 | YLRREQMFV | (275-283) |
| | 5109 | TLQANKSEV | (238-246) |
| 10 | 5112 | ILEDWNFGL | (426-434) |
| | 5113 | TLEDTYRFV | (441-449) |
| | 2016 | SLWLPSEATVYL | (28-39) |
| | 2017 | NLASSNYFPT | (311-320) |
| | 2018 | TLTADVMTYI | (408-417) |
| 15 | 2019 | YLPPVPVSKV | (38-47) |
| | 2020 | YDLQFIFQL | (396-404) |
| | 2021 | FQLCKITLT | (402-410) |
| | 2022 | ICWGNQLFV | (349-357) |
| | 2023 | KVVSTDEYV | (46-54) |
| 20 | 2024 | QLFVTVVDT | (354-362) |
| | 2025 | GLQYRVFRI | (93-101) |

- Des weiteren wurden um jeweils 9 Aminosäuren überlappende 20mer-Peptide synthetisiert, welche die Sequenz des L1 und des E7 Proteins von HPV16 um-

25

fassen. Die Peptide wurden von 1 bis 52 durchnummeriert. Ihr Name und ihre

- 31 -

Sequenz sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt, in der "restr." restringiert bedeutet.

Tabelle 2: Synthetische überlappende 20mer Peptide von HPV16 L1 und E7

5

| Peptid Name | Sequenz | relative Position | Epitop- Information |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------|--|
| <u>L1-Peptide</u> | | | |
| 1 | MSLWLPSEATVYLPPVPVSK | (1-20) | |
| 2 | YLPPVPVSKVVSTDEYVART | (12-31) | |
| 3 | STDEYVARTNIYYHAGTSRL | (23-42) | |
| 4 | YYHAGTSRLLAVGHPYFPIK | (34-53) | |
| 5 | VGHPYFPIKKPNNKILVPK | (45-64) | |
| 6 | NNNKILVPKVSGLQYRVFRI | (56-75) | |
| 7 | GLQYRVFRIHLDPDNKFGFP | (67-86) | |
| 8 | PDPNKFGFPDTSFYNPDTQR | (78-97) | |
| 9 | SFYNPDTQRLVWACVGVEVG | (89-108) | zytotox. Epitop, HLA A24 restr. |
| 10 | WACVGVEVGGRGQPLGVGISG | (100-119) | |
| 11 | QPLGVGISGHPLLNLKDDTE | (111-130) | |
| 12 | LLNLKDDTENASAYAANAGV | (122-141) | |
| 13 | SAYAANAGVDNRECISMDYK | (133-152) | |
| 14 | RECISMDYKQTQLCLIGCKP | (144-163) | |
| 15 | QLCLIGCKPPIGEHWGKGSP | (155-174) | |
| 16 | GEHWGKGSPCTNVAVNPGDC | (166-185) | |
| 17 | NVAVNPGDCPPLELINTVIQ | (177-196) | |
| 18 | LELINTVIQDGMVDTGFGA | (188-207) | |
| 19 | DMVDTGFGAMDFTTLQANKS | (199-218) | |
| 20 | FTTLQANKSEVPLDICTSIC | (210-229) | |
| 21 | PLDICTSICKYPDYIKMVSE | (221-240) | |
| 22 | PDYIKMVSEPYGDSLFFYLRL | (232-251) | |

- 32 -

| | | | |
|----|-----------------------------|------------------|--|
| 23 | GDSLFFYLRRQMFVRHLFN | (243-262) | |
| 24 | QMFVRHLFN RAGAVGENVPD | (254-273) | |
| 25 | GAVGENVPDDLYIKSGSTA | (265-284) | |
| 26 | YIKSGSTANLASSNYFPTP | (276-295) | |
| 27 | ASSNYFPTPSGSMVTSDAQI | (287-306) | T-Helfer Epitop |
| 28 | SMVTSDAQIFNKPYWLQRAQ | (298-317) | T-Helfer Epitop |
| 29 | KPYWLQRAQGHNNGICWGNQ | (309-328) | |
| 30 | NNGICWGNQLFVTVDTTTS | (320-339) | |
| 31 | VTVDTTTRSTNMSLCAAIST | (331-350) | |
| 32 | MSLCAAISTSETTYKNTNFK | (342-361) | |
| 33 | TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL | (353-372) | |
| 34 | LRHGEEYDLQFIFQLCKITL | (364-383) | |
| 35 | IFQLCKITLTADVMTYIHSM | (375-394) | |
| 36 | DVMTYIHSMNSTILEDWNFG | (386-405) | |
| 37 | TILEDWNFGLQPPPGGTLED | (397-416) | |
| 38 | PPPGGTLED TYRFVTSQAIA | (408-427) | |
| 39 | RFVTSQAIA CQKHTPPAPKE | (419-438) | |
| 40 | KHTPPAPKEDPLKKYTFWEV | (430-449) | |
| 41 | LKKYTFWEVNLKEKFSADLD | (441-460) | |
| 42 | KEKFSADLDQFPLGRKFLLO | (452-471) | |
| 43 | PLGRKFLLOAGMHGDTPTLH | (463-482) | zytotox. Epitop HLA A1 restr. |

E7-Peptide

| | | | |
|----|-----------------------------|----------------|--|
| 44 | MHGDTPTLHEYMLDLQPETT | (1-20) | |
| 45 | MLDLQPETTDLYCYEQLNDS | (12-31) | zytotox. Epitop HLA A1 restr. |
| 46 | YCYEQLNDSSEEDEIDGPA | (23-42) | |
| 47 | EEDEIDGPAGQAEPDRAHYN | (34-53) | zytotox. Epitop HLA A1 restr. |
| 48 | AEPDRAHYNIVTFCKCDST | (45-64) | zytotox. Epitop HLA A1 restr. |
| 49 | TFCKCDSTLRLCVQSTHVD | (56-75) | |
| 50 | LCVQSTHVDIRTLEDLLMGT | (67-86) | |
| 51 | TLEDLLMGTLGIVCPICSQKP | (78-97) | |

- 33 -

Influenza Kontrollpeptid

52 KEYLRHGEEGILGFVFTLCK

- Golgi Plug ist durch Pharmingen (Hamburg, Deutschland) erhältlich.
- Monensin ist durch Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erhältlich.
- 5 • IL-2 wurde von Becton Dickinson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- MTT-Lösung in PBS bedeutet 2,5 mg/ml 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).
- PBS bedeutet „phosphate buffered saline“ und besteht aus 16,6 mM Na_2HPO_4 , 8,4 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl pH 7,4.
- 10 • Zellen wurden jeweils bei 37°C und 5% CO_2 in RPMI-Medium (Gibco BRL, Eggenstein; Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum, Kanamycin und Ampicillin kultiviert.
- Luma-Platten und der Canberra-Packard B-Plate Counter wurden von Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland bezogen.
- 15 • FACScan calibur bedeutet 'fluorescens activated cell sorter' die Apparatur wurde von Becton Dickenson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- Cellquest Software wurde von Becton Dickinson (Hamburg, Deutschland) bezogen.

2. Peptid-spezifische TNF α -Sekretion durch CVLP-stimulierte T-Zellen

a) Herstellung CVLP-spezifischer T-Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) eines HLA A2.01 positiven Spenders wurden für
5 8 Wochen mit HPV16 L1 Δ C•E7₁₋₅₅ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher
Zugabe von 1 μ g/ml CVLPs, 10^5 bestrahlten periphere Blutmononukleäre
Zellen (PMBC) und 10 IU/ml IL-2 stimuliert und geerntet.

b) Stimulation mit Antigenen

10 Die Zellen wurden über Nacht in 100 μ l Medium bei 37°C mit unterschied-
lichen Antigenen (PMBC + E7-Peptid; PMBC + HPV16 L1 Δ C•E7₁₋₅₅
(CVLP); PMBC + 5104, 5105, 5106, 5107, 5108, 5109, 5112, 5113 je 10
 μ g/ml) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL-2 stimuliert. Während dieser Zeit
produzieren stimulierte Zellen TNF α .

15

c) TNF α -Nachweis

Am nächsten Tag wurden 50 μ l Überstand entnommen, eingefroren, wieder
aufgetaut (um evtl. mitgenommene Zellen abzutöten) und zu 50 μ l einer
Zellsuspension gegeben, die $0,9 \times 10^6$ WEHI-Zellen, 2 μ g/ml Actinomycin
20 D und 400 mM LiCl enthält. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inku-
biert. Während dieser Zeit leitet TNF α (sofern im Überstand enthalten)
Apoptose der WEHI-Zellen ein. Durch Zugabe von 50 μ l einer 2,5 mg/ml
MTT-Lösung in PBS wurden innerhalb von 3 Stunden nicht apoptotische
Zellen braun angefärbt, apoptotische Zellen hingegen blieben gelb. Sämtli-
25 che Zellen wurden durch Zugabe von 100 μ l Lysis-Puffer (34% N,N dime-
thylformamide, 20% sodium dodecyl sulfate) und eine Inkubation für min-
destens 6 Stunden bei 37° lysiert, so daß die Farbstoffe freigesetzt wurden.
Abschließend wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen.

Fig. 1 zeigt die unterschiedlichen Antigene aufgetragen gegen die gemessene Absorption bei 595 nm. Niedrige Absorption bedeutet geringe Farbstoffproduktion und somit viele apoptotische Zellen, die somit viel $\text{TNF}\alpha$ ausgesetzt waren, so daß die zugehörigen T-Zellen stimuliert worden waren. Somit war die Stimulation der T-Zellen umso besser, je niedriger die Absorption bei 595 nm ist.

Ergebnis: Die Peptide 5104, 5106, 5107, 5108, 5109 und 5112 waren in der Lage, CVLP-spezifische T-Zellen zu stimulieren.

10

3. Bindung von Peptiden an T2-Zellen

a) Beladung der T2-Zellen

15 2,5x 10⁶ T2-Zellen eines HLA A2.01 positiven Spenders wurden in Medium enthaltend 2% humanes Serum über Nacht in Anwesenheit von 0, 10 oder 100 µg/ml 5105, 5106, 5107, 5109, 5112, 5113, InfluenzaMP, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025 Peptid bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit können passende Peptide an die unphysiologisch leeren MHC-1 Moleküle binden und diese somit stabilisieren, wohingegen MHC-1 Moleküle ohne passende Peptide relativ schnell wieder in die Zelle aufgenommen werden. Somit erhöhen spezifisch bindende Peptide die Anzahl der MHC-1 Moleküle auf der Zelloberfläche.

25 b) Nachweis der Peptidbindung an MHC-1 Komplexe der T2-Zellen

Am nächsten Morgen wurden die Zellen geerntet, mit PBS enthaltend 0,5% bovines Serumalbumin (BSA) gewaschen und die MHC-1 Moleküle

nachgewiesen. Dies erfolgt durch die Inkubation für 30 min auf Eis mit dem Antikörper BB7.2, Waschen und Färbung mit einem α -Maus FITC-Antikörper für weitere 30 min auf Eis. Die Zellen wurden erneut gewaschen, in einem FACScan calibur gemessen und mit Cellquest Software analysiert.

Fig. 2 zeigt die verschiedenen Peptide aufgetragen gegen die gemessene Fluoreszenz.

Ergebnis: T2-Zellen nach Inkubation mit den L1-Peptiden 5106, 5107, 5109, 5112, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 und 2022 zeigen wie nach Inkubation mit dem bekannten Influenza-Peptid MP deutlich mehr MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche, was auf eine Bindung der entsprechenden Peptide an die MHC-Moleküle hindeutet.

4. Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) eines HLA A2.01 positiven Spenders wurden für 8 Wochen mit HPV16 L1_{ΔC}•E7₁₋₅₅ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml CVLPs sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit 10 µg/ml verschiedener Antigene in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 und 0,5 µg/ml α -human CD28 restimuliert:

- a) über Nacht mit CVLP-inkubierten PBMC
- b) über Nacht mit L1 2022-Peptid inkubierten PBMC

- 37 -

- c) über Nacht mit L1 2025-Peptid (Kontroll-Peptid) inkubierten PBMC

Nach einer Stunde wurde 1 µl Golgi Plug zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-hum CD3/PE, mit α-hum CD4/Cychrome und mit α-hum Interferon γ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

- 10 Ergebnis: Fig. 3 zeigt, daß die CVLP-inkubierten PBMC wie auch die mit dem L1-Peptid 2022-inkubierten PBMC eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten, nicht aber die mit dem Kontroll-Peptid inkubierten PBMC.

15 5. Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) eines HLA A1 positiven Spenders wurden für 5 Wochen mit HPV16L1_{ΔC}•E7₁₋₅₅ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml CVLPs sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit 10 µg/ml der auf der X-Achse von Fig. 4 angegebenen Peptide in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.

25

Nach einer Stunde wurde 1 µl Monensin (300 µM) zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-hum CD8/PE, mit α-hum CD4/Cychrome und mit α-

hum Interferon γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

- 5 Ergebnis: Fig. 4 zeigt, daß die mit den Peptiden 43, 47 und 48-inkubierten PBMC eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten, nicht aber die mit den übrigen Peptiden inkubierten PBMC. Das Peptid 43 enthält das 9mer-Peptid der Sequenz MHGDTPTLH, die beiden überlappenden Peptide 47 und 48 enthalten das 10mer-Peptid der Sequenz QAEPDRAHYN, die jeweils in Kast et al. (supra) als HLA A1 bindende Peptide beschrieben wurden, für die jedoch noch kein funktioneller Nachweis geführt werden konnte.
- 10

6. Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

15

- Humane T-Zellen (4×10^5) eines nicht-HLA-typisierten Spenders wurden für 6 Wochen mit HPV16L1_{ΔC}•E7₁₋₅₅ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml CVLPs sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 20 37°C mit 10 µg/ml der auf der X-Achse von Fig. 5 angegebenen Peptide in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.

- Nach einer Stunde wurde 1 µl Monensin (300 µM) zugegeben. Die Zellen wurden 25 für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α -hum CD8/PE, mit α -hum CD4/Cychrome und mit α -hum Interferon γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung

in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cell-quest Software analysiert.

Ergebnis: Fig. 5 zeigt, daß die mit den Peptiden 27 und 28-inkubierten PBMC eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten, nicht aber die mit den übrigen Peptiden inkubierten PBMC. Die beiden überlappenden Peptide 27 und 28 enthalten das Peptid der Sequenz SMVTSDAQI, so daß das tatsächlich erkannte Peptid im wesentlichen diese Sequenz umfassen muß.

10

7. Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) eines HLA A1-positiven Spenders wurden für 6 Wochen mit HPV16L1_{ΔC}-E7₁₋₅₅ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml CVLPs sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet.

20

Die 20mer-Peptide 1 bis 51 wurden gemäß der Matrix

| Pools | A | B | C | D | E | F | G | H |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 2 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 3 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 4 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 |

| | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 5 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 6 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |
| 7 | 49 | 50 | 51 | | | | | |

in Peptidpools A bis H bzw. 1 bis 7 zusammengefaßt.

- Anschließend wurden die T-Zellen eines HLA A1 positiven Spenders in 100 µl Medium bei 37°C mit den Peptidpools in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 µg/ml zugegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.
- 10 Nach einer Stunde wurde 1 µl Golgi Plug zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-hum CD8/PE, mit α-hum CD4/Cychrome und mit α-hum Interferon γ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

Ergebnis: Fig. 6 zeigt, daß die mit den Peptidpools E und 6 inkubierten PBMC eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten, nicht aber die mit den übrigen Peptidpools inkubierten PBMC. Die Peptidpools E und 6 enthalten gemeinsam das Peptid 45, das somit aller Voraussicht nach für die Restimulation der CVLP-stimulierte T-Zellen verantwortlich ist. Das Peptid 45 enthält wiederum das Peptid ETDLICY, das Kast et al. (supra) als HLA A1 bindendes Peptid beschrieben hat, für das jedoch noch kein funktioneller Nachweis geführt werden konnte.

Des weiteren wurden die T-Zellen eines HLA A24 positiven Spenders mit den Peptidpools wie oben restimuliert und analysiert.

5 Ergebnis: Fig. 7 zeigt, daß die mit den Peptidpools A und 2 inkubierten PBMC eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten, nicht aber die mit den übrigen Peptidpools inkubierten PBMC. Die Peptidpools A und 2 enthalten gemeinsam das Peptid 9, das somit aller Voraussicht nach für die Restimulation der CVLP-stimulierte T-Zellen verantwortlich ist. Die Voraussage nach Parker et
10 al. (supra) ergibt ein potentiell Peptid für HLA A24 mit der Sequenz FYNPDTQRL, das somit voraussichtlich für die Aktivität des Peptids 9 verantwortlich ist.

15 8. Lyse von mit Peptid 9 beladenen BLCL-Zellen

BLCL-Zellen eines HLA A24-positiven Spenders wurden mit ^{51}Cr für eine Stunde bei 37°C inkubiert, dreimal mit Medium gewaschen und in 2 Aliquots aufgeteilt. Zum einen Aliquot der Zellen wurden 10 µg/ml von Peptid 9 gegeben, das andere Aliquot diente als Negativkontrolle in Abwesenheit eines Peptids. Anschlie-
20 ßend wurden jeweils 2000 der Zellen (=Zielzellen) zu ansteigenden Mengen von T-Zellen (=Effektorzellen) in einem Gesamtvolumen von 150 µl gegeben. Die T-Zellen waren zuvor über 5 Wochen mit einem Gemisch aus 43 Peptiden (Peptide 1-43, je 1 µg/ml) stimuliert worden. Parallel wurden Ansätze für spontane und
25 maximale Lyse der Zellen angesetzt. Für die spontane Lyse dienten Zielzellen, die in Medium inkubiert wurden, für die maximale Lyse dienten Zielzellen, die mit 0,5% Triton inkubiert wurden. Die Ansätze wurden für 5 h bei 37°C inkubiert. 50 µl Überstand der Ansätze wurden auf Luma-Platten gegeben und über Nacht bei

Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten morgen wurde die Menge an radioaktivem ^{51}Cr mit Hilfe eines Canberra-Packard B-Plate Counter bestimmt (Counts) und in Relation zu den maximal lysierten Zellen des Triton-Ansatzes gesetzt. Dabei wurden die % spezifische Lyse nach der Formel:

5
$$x = 100 \cdot (\text{counts} - \text{spontan counts}) / (\text{maximal counts} - \text{spontan counts})$$

bestimmt.

Fig. 8 zeigt, daß die mit dem Peptid 9 beladenen BLCL-Zellen effektiv durch die T-Zellen lysiert werden konnten, die nicht beladenen BLCL-Zellen hingegen
10 nicht. Das Peptid 9 ist somit ein HLA A24 restringiertes zytotoxische T-Zellepitop.

Patentansprüche

1. T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLYCY, QAEPDRAHYN, SMVTSDAQI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.
5
- 10 2. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine Sequenzhomologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLYCY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene besitzt.
15
- 20 3. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine strukturelle Homologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV FYNPDTQRL, MHGDTPTLH, ETTDLYCY, QAEPDRAHYN oder SMVTSDAQI hat.
25
4. T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das T-Zell-Epitop ein zytotoxisches T-Zell-Epitop ist.

5. Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist.
6. Verbindung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid, insbesondere ein Fusionsprotein ist.
7. Verbindung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9-13 Aminosäuren Länge ist.
8. Verbindung nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung eine chemische, radioaktive, nicht radioaktive Isotopen und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins, und/oder eine chemische Modifikation des T-Zell-Epitops und/oder Fusionsproteins enthält.
9. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 kodiert.
10. Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 enthält.

11. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 enthält, vorzugsweise präsentiert.
- 5 12. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert, und/oder infiziert ist.
- 10 13. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wurde.
- 15 14. Zelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine dendritische Zelle, ein Fibroblast, insbesondere eine JY-, T2-, CaSki-Zelle oder EBV-transformierte Zelle ist.
- 20 15. Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und mindestens eine weitere Verbindung.
- 25 16. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex mindestens ein MHC-Klasse I-Molekül, vorzugsweise als HLA A2.01 Tetramer enthält.

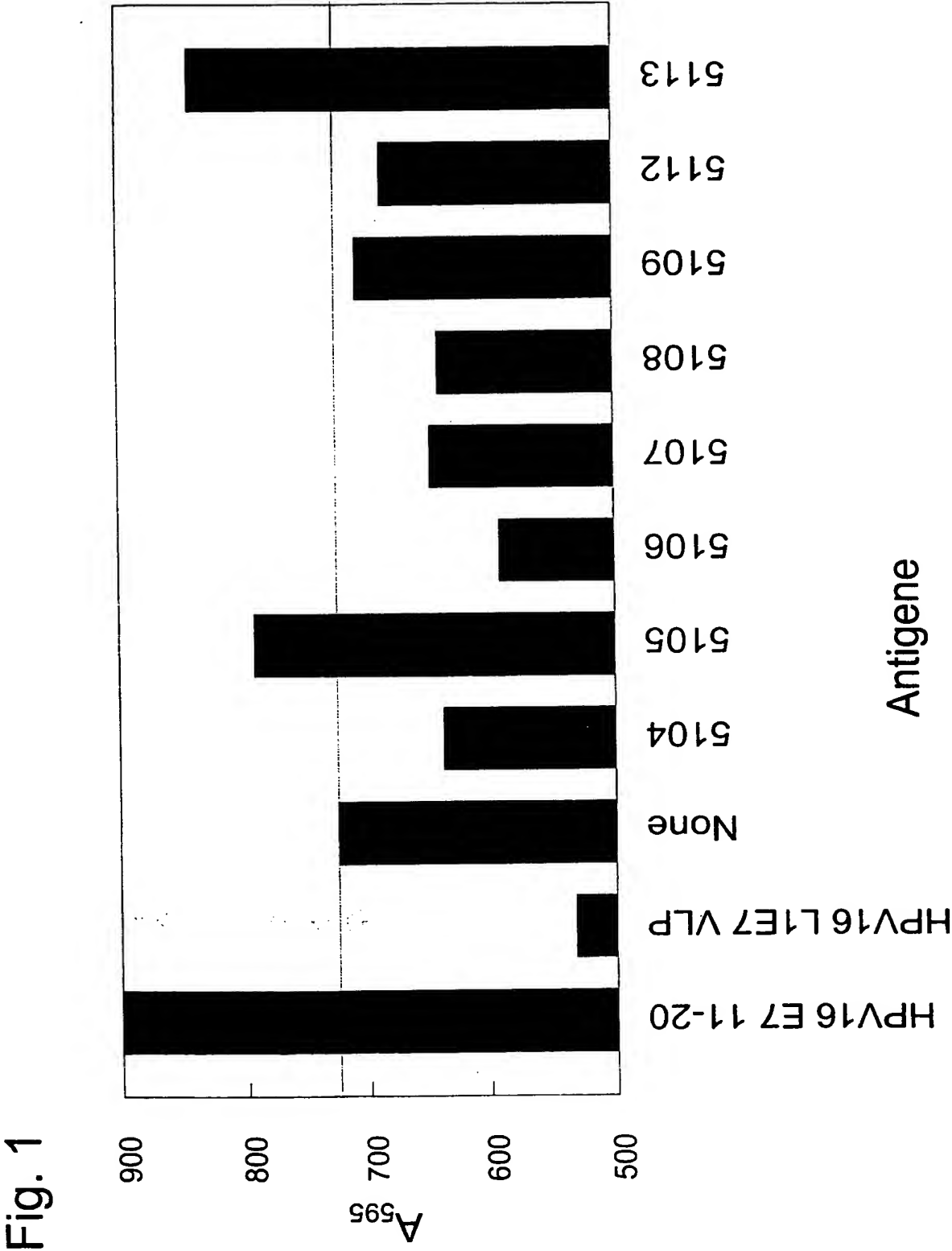
17. Komplex nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte MHC-Klasse I Molekül ein humanes MHC-Klasse I Molekül, insbesondere ein HLA A2.01 Molekül ist.
- 5 18. Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, das folgende Schritte enthält: - - - - -
- 10 a) Stimulation von Zellen mit mindestens einer genannten Verbindung;
- b) Zugabe von mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert oder eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
- c) Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es nach Schritt a) folgenden zusätzlichen Schritt a') enthält:
- 15 a') Cokultivierung der Zellen für mindestens ca. 1 Woche, insbesondere mindestens ca. 8 Wochen mit:
- 20 (i) mindestens einer Zielzelle beladen mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- (ii) mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17,
- 25 (iii) und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert,
- bevor sich Schritt b) anschließt.

20. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 13, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wird.
21. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 12, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzellen mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert und/oder infiziert wird.
22. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine dendritische Zelle, ein Fibroblast, insbesondere eine JY-, T2-, CaSki-Zelle oder EBV-transformierte Zelle ist.
23. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle von Schritt a) folgender Schritt a'') durchgeführt wird:
a'') Gewinnung und Präparation von Proben enthaltend T-Zellen und anschließende Kultivierung.
24. Testsystem zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:
a) mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, und

- b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

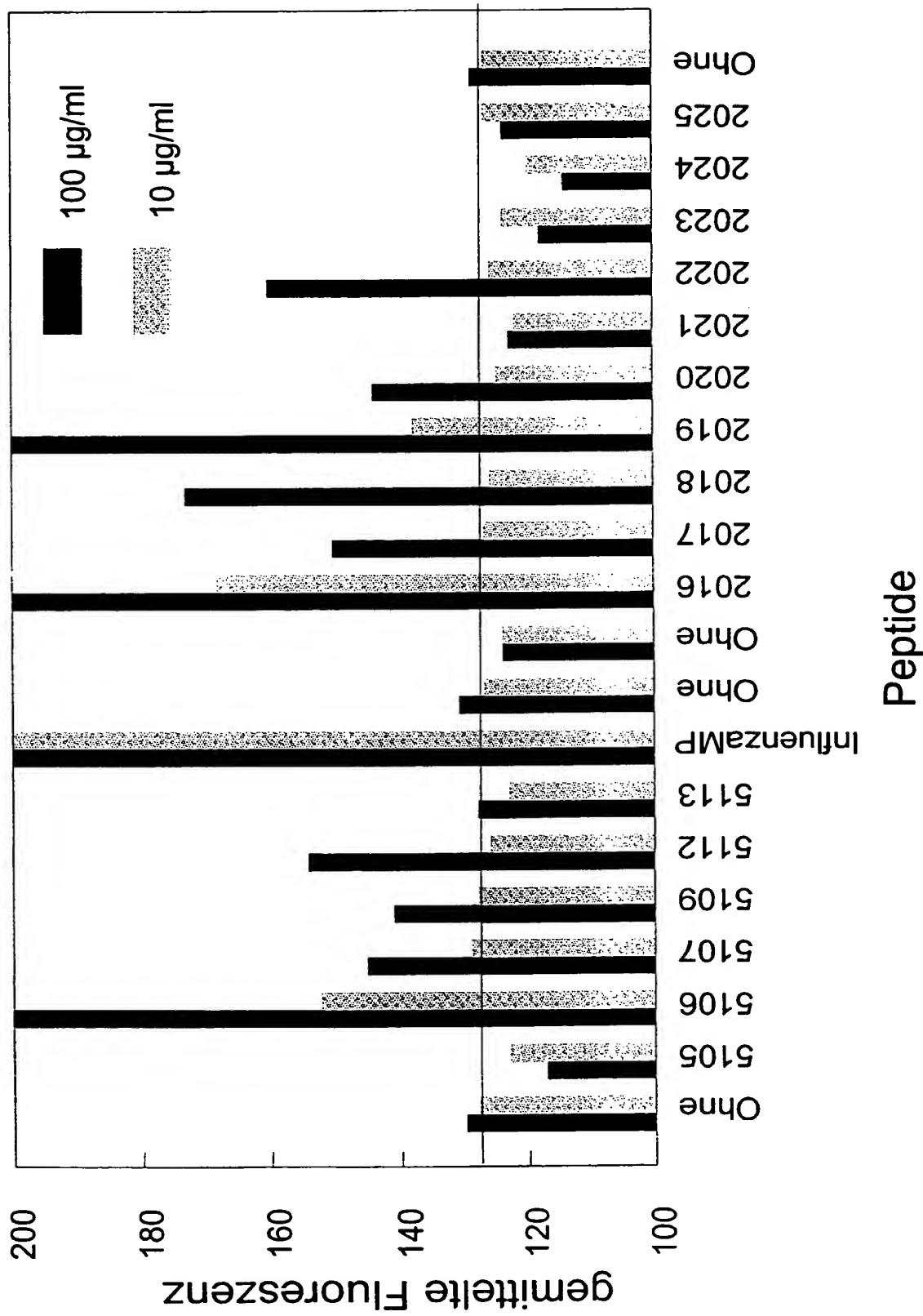
25. Verwendung mindestens eines T-Zell-Epitops gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens eines Vektors gemäß Anspruch 10, mindestens einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17 zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.
26. Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
27. Arzneimittel oder Diagnostikum nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens ein Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens ein Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 in Lösung vorliegt, an eine feste Matrix gebunden ist, und/oder mit einem Adjuvans versetzt ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



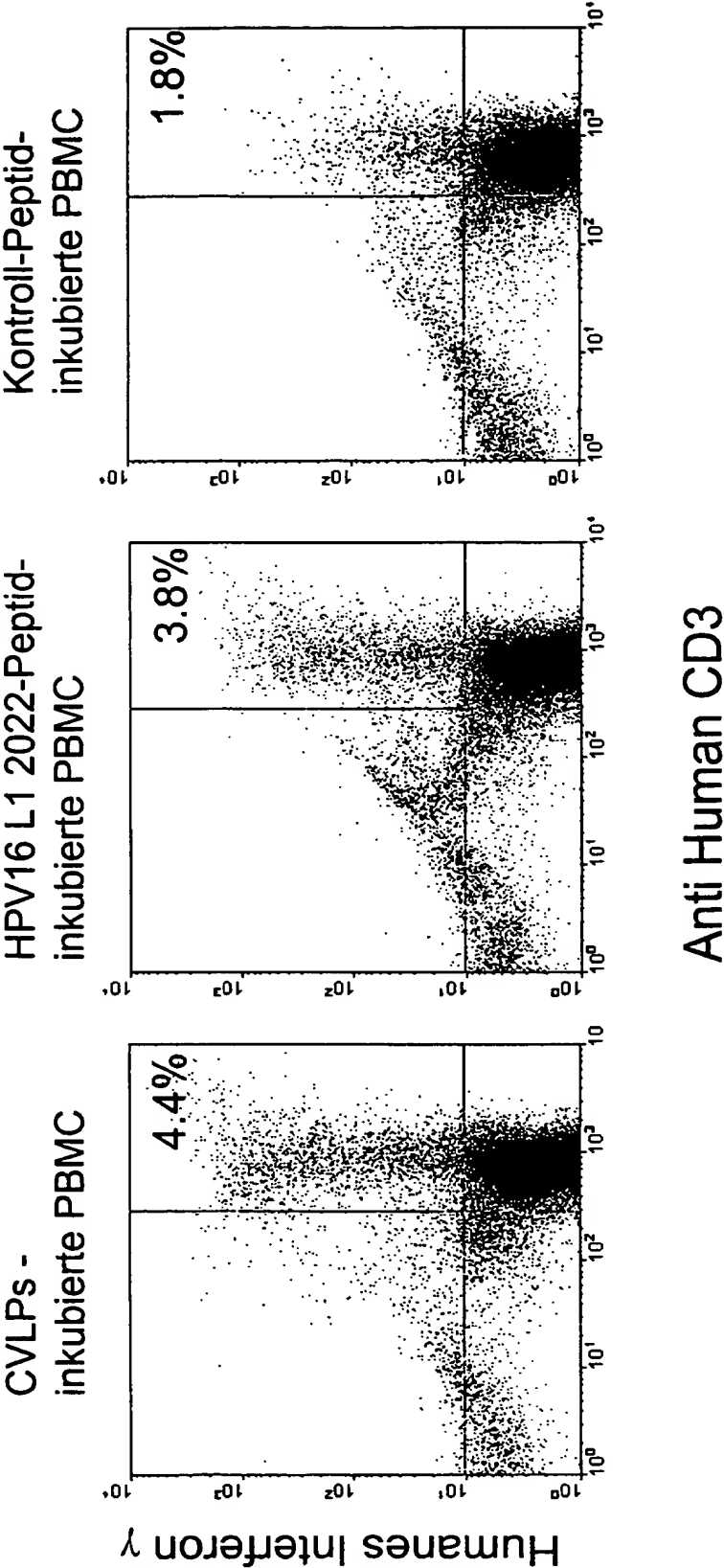
THIS PAGE BLANK (USP, C.)

Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USF) L.

Fig. 3



THIS PAGE BLANK (USP)

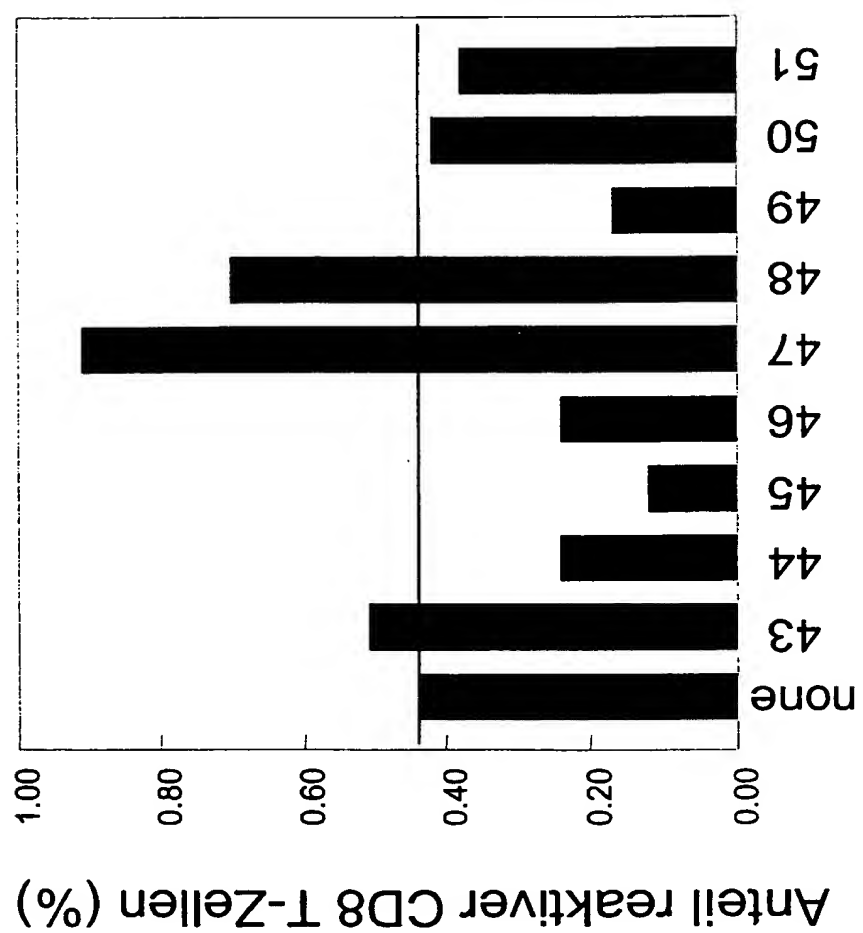
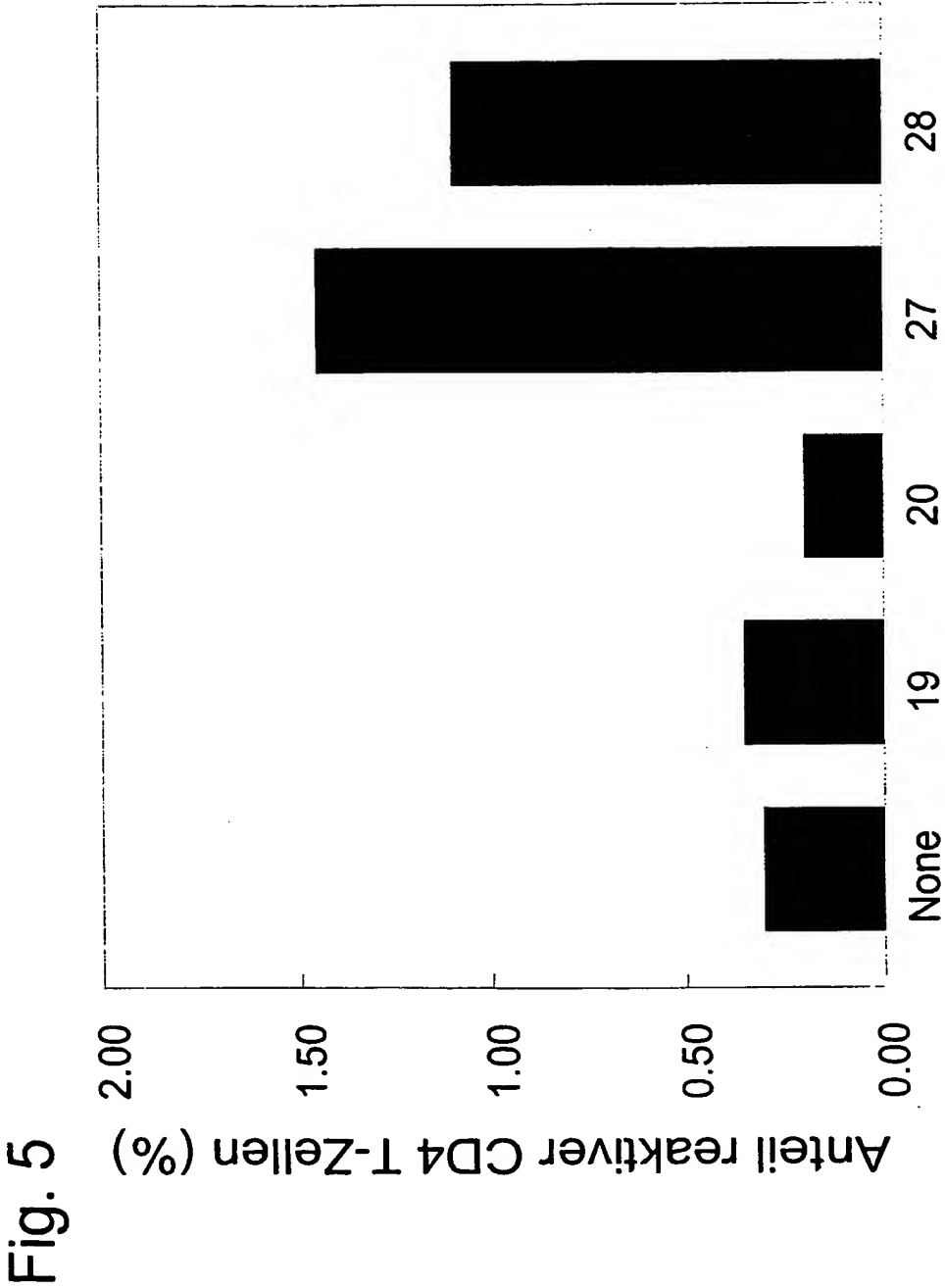
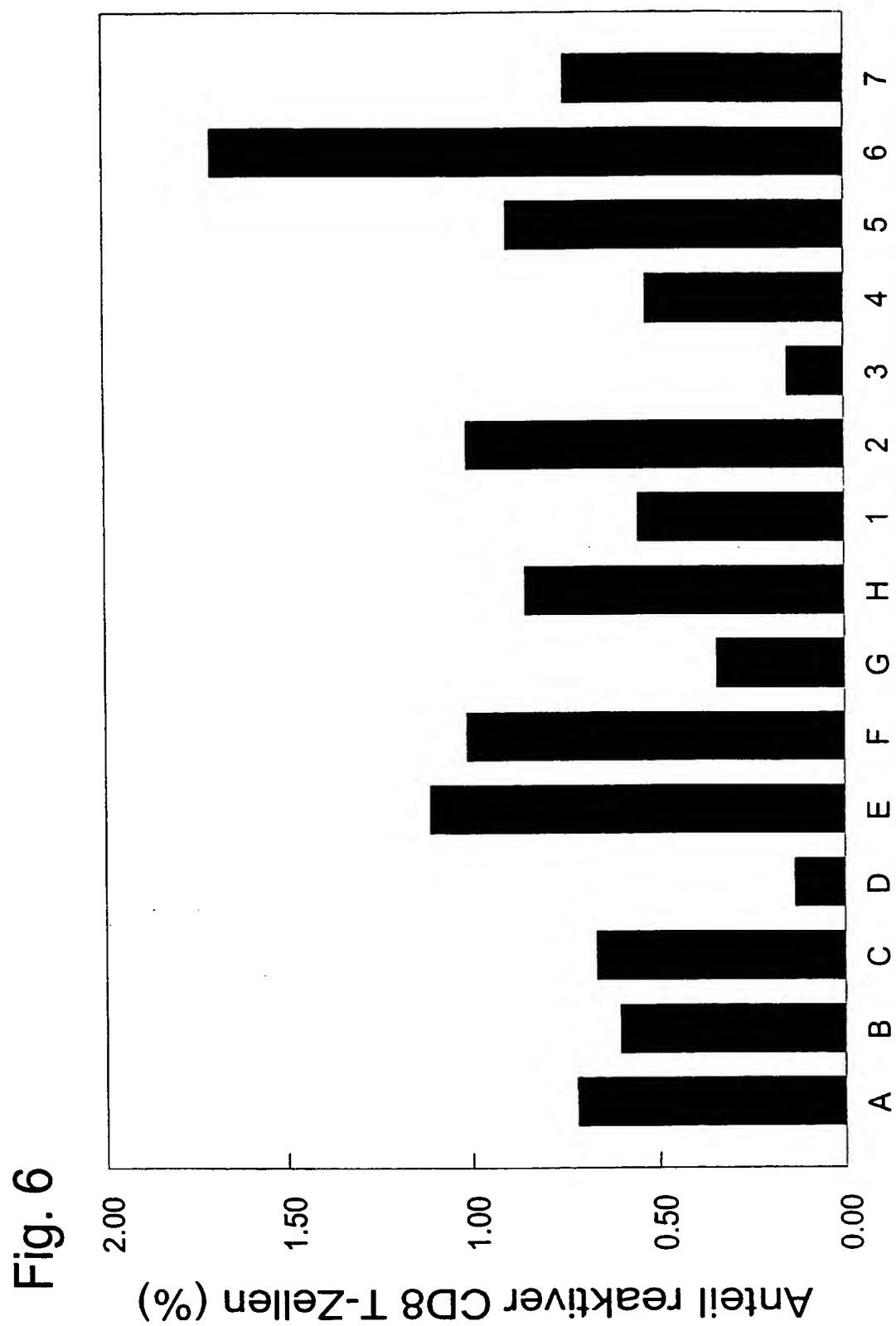


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

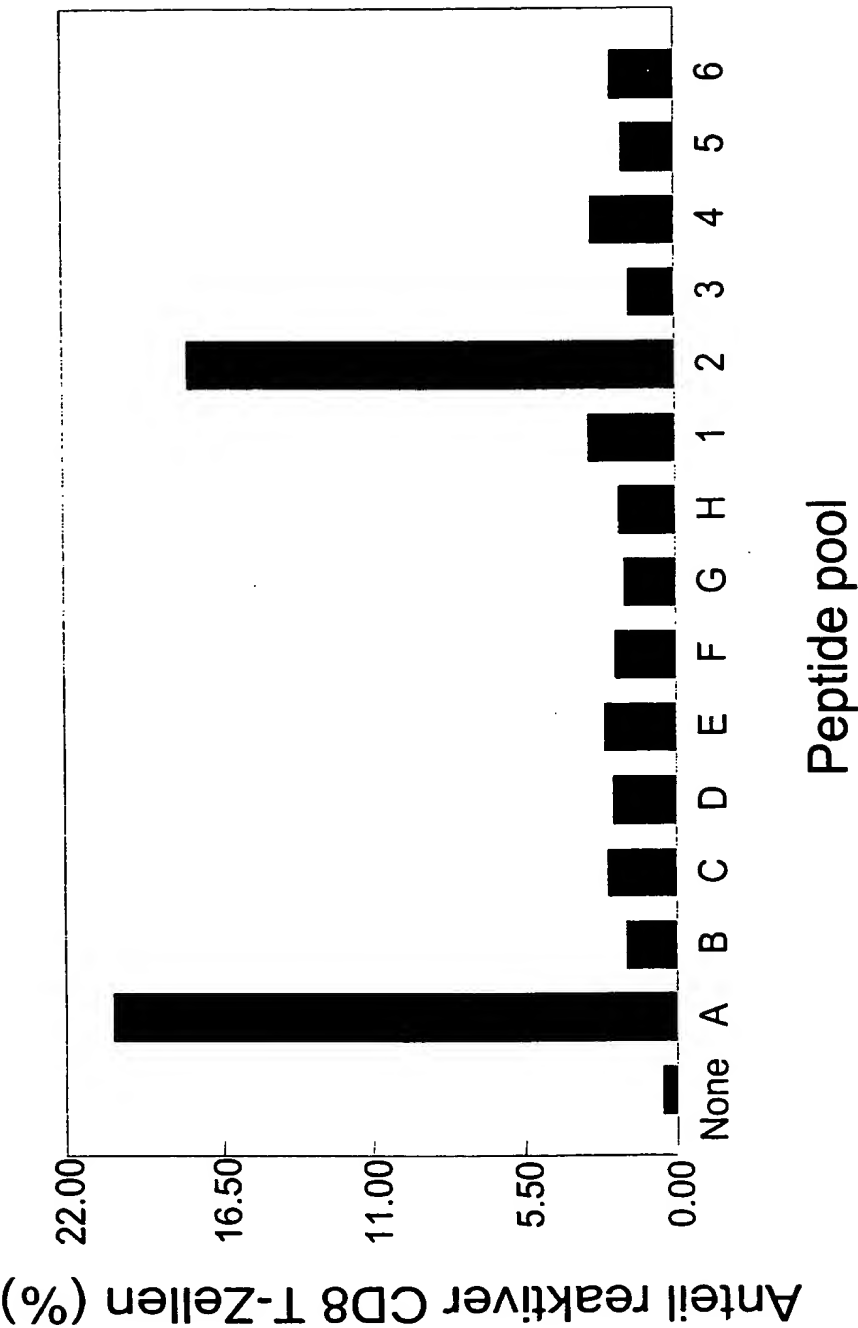


THIS PAGE BLANK (U)

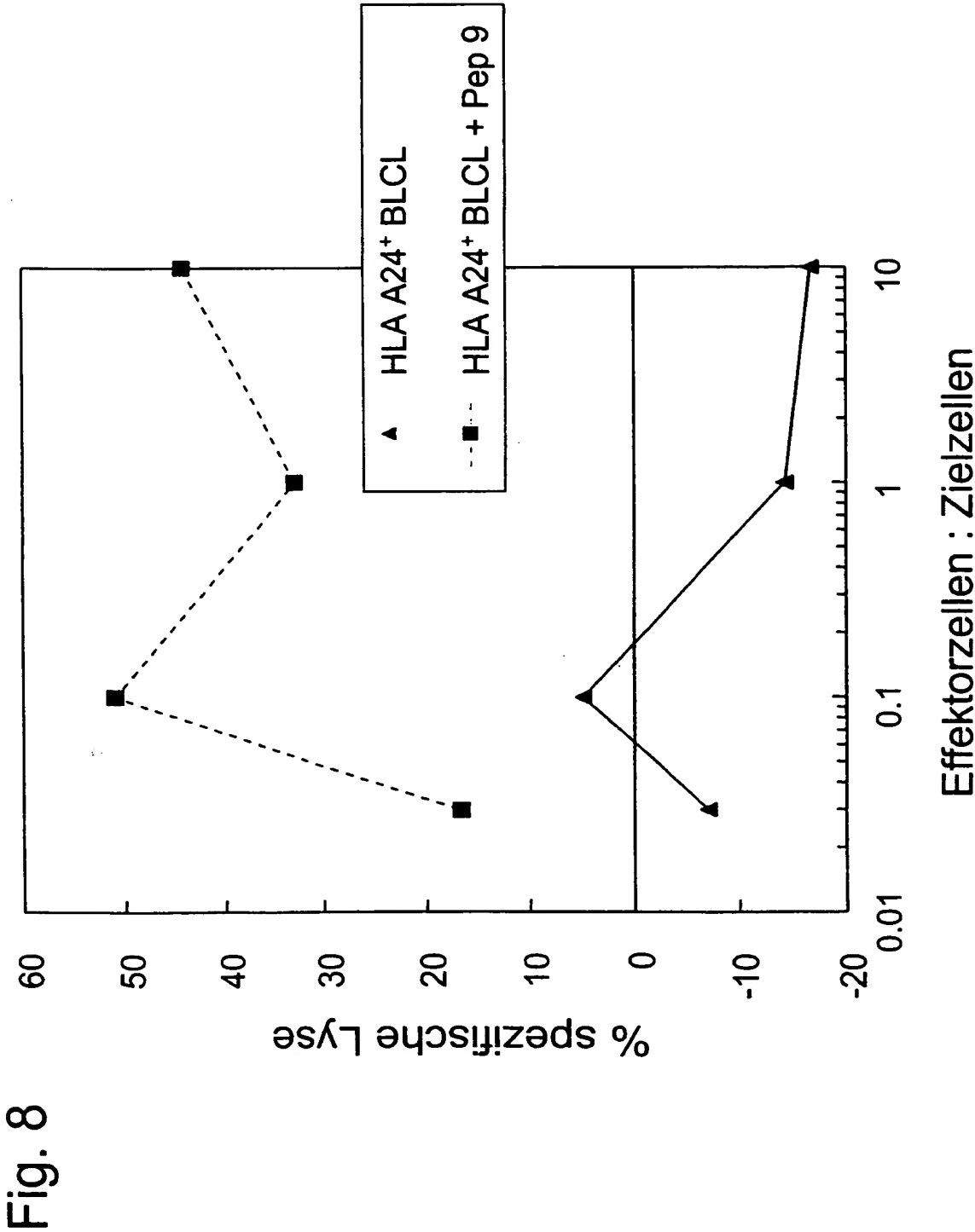


THIS PAGE BLANK

Fig. 7



THIS PAGE BLANK (USP)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> MediGene AG

5 <120> Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus L1-Proteins und ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie

<150> DE 199 25 199.1

<151> 1999-06-01

<160> 77

<170> Windows NT, Word 97

10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15

<400> 1

Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly Leu 9

1

20

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

25

<400> 2

Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val 9

1

30

<210> 3

<211> 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 3

5

His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val 9

1

<210> 4

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 4

15

Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val 9

1

<210> 5

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 5

25

Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val 9

1

<210> 6

30

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 6

Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu 9

1

5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

10

<400> 7

Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu 12

1

11

15

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

20

<400> 8

Asn Leu Ala Ser Ser Asn Tyr Phe Pro Thr 10

1

25

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 9

30

Thr Leu Thr Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile 10

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

5

<400> 10

Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser Lys Val 10

1

10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15

<400> 11

Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu 9

1

20

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

25

<400> 12

Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val 9

1

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

5

<400> 13

Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu 9

1

10 <210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15 <400> 14

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His 9

1

<210> 15

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 15

25 Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr 8

1

<210> 16

<211> 10

30 <212> PRT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 16

5 Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn 10

1

<210> 17

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 17

Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile 9

15 1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Influenzavirus Typ A

<400> 18

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 9

1

25

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 19

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr 10

1

5 <210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

10 <400> 20

Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu 9

1

<210> 21

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 21

20 Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val 9

1

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 22

Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr 9

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 23

Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val 9

1

10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15

<400> 24

Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr 9

1

20 <210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

25 <400> 25

Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile 9

1

<210> 26

30 <211> 20

<212> PRT

THIS PAGE BLANK (USPTO

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 26

5 Met Ser Leu Try Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro

1

11

Val Ser Lys

20

10 <210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15 <400> 27

Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val

1

11

Ala Arg Thr

20

20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

25

<400> 28

Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr

1

11

THIS PAGE BLANK (USP12)

Ser Arg Leu

20

5 <210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

10 <400> 29

Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe

1

11

Pro Ile Lys

20

15 <210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

20 <400> 30

Val Gly His Pro Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu

1

11

Val Pro Lys

20

25 <210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 31

Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val

1

11

Phe Arg Ile

5

20

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

10

<400> 32

Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe

1

11

Gly Phe Pro

15

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 33

Pro Asp Pro Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro

1

11

25 Asp Thr Gln Arg

20

<210> 34

<211> 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 34

5 Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly

1

11

Val Glu Val Gly

20

10

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15

<400> 35

Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val

1

11

Gly Ile Ser Gly

20

20

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

25

<400> 36

Gln Pro Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp

1

11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asp Thr Glu

20

<210> 37

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 37

10 Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala

1

11

Asn Ala Gly Val

20

15 <210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

20 <400> 38

Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile Ser Met

1

11

Asp Tyr Lys

20

25

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO,

<400> 39

Arg Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly

1

11

5 Cys Lys Pro

20

<210> 40

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 40

Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys

15 1

11

Gly Ser Pro

20

<210> 41

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 41

25 Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val Ala Val Asn Pro

1

11

Gly Asp Cys

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 42

Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn

1

11

10 Thr Val Ile Gln

20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 43

Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly

1

11

20 Phe Gly Ala

20

<210> 44

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 44

Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe Thr Thr Leu Gln

1

11

Ala Asn Lys Ser

5

20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 45

Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr

1

11

15 Ser Ile Cys

20

<210> 46

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 46

Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met

25

1

11

Val Ser Glu

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 47
<211> 20
<212> PRT
<213> Humanes Papillomavirus Typ 16
5
<400> 47
Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe
1 11
Tyr Leu Arg
10 20

<210> 48
<211> 20
<212> PRT
15 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 48
Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg
1 11
20 His Leu Phe Asn
20

<210> 49
<211> 20
25 <212> PRT
<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 49

Gln Met Phe Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu

1

11

Asn Val Pro Asp

5

20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 50

Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser

1

11

15 Gly Ser Thr Ala

20

<210> 51

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 51

Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser Ser Asn Tyr Phe

25

1

11

Pro Thr Pro

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

5

<400> 52

Ala Ser Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp

1

11

Ala Gln Ile

10

20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 53

Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln

1

11

20 Arg Ala Gln

20

<210> 54

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20

<400> 54

Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp

1

11

Gly Asn Gln

5

20

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 55

Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp

1

11

15 Thr Thr Arg Ser

20

<210> 56

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 56

Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala

25

1

11

Ala Ile Ser Thr

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 57

Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu Thr Thr Tyr Lys Asn Thr

1

11

10 Asn Phe Lys

20

<210> 58

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 58

Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu

20 1

11

Glu Tyr Asp Leu

20

<210> 59

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

30 <400> 59

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys

1

11

Lys Ile Thr Leu

20

5

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

10

<400> 60

Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile

1

11

His Ser Met

15

20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

20

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 61

Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp

1

11

25 Asn Phe Gly

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

5

<400> 62

Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr

1

11

Leu Glu Asp

10

20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 63

Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln

1

11

20 Ala Ile Ala

20

<210> 64

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 64

Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala

1

11

Pro Lys Glu

5

20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 65

Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe

1

11

15 Trp Glu Val

20

<210> 66

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 66

Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser

25

1

11

Ala Asp Leu Asp

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

5

<400> 67

Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys

1

11

Phe Leu Leu Gln

10

20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 68

Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Met His Gly Asp Thr

1

11

20 Pro Thr Leu His

20

<210> 69

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 69

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln

1

11

Pro Glu Thr Thr

5

20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 70

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln

1

11

15 Leu Asn Asp Ser

20

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 71

Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile

1

11

25 Asp Gly Pro Ala

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

5

<400> 72

Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala

1

11

His Tyr Asn

10

20

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

15

<400> 73

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys

1

11

Asp Ser Thr

20

20

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 74

Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser

1

11

Thr His Val Asp

5

20

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

10

<400> 75

Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu

1

11

Leu Met Gly Thr

15

20

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

20 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 76

Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys

1

11

25 Ser Gln Lys Pro

21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Influenzavirus Typ A

5

<400> 20

Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr

1

11

Lys Cys Lys

10

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Classification No.
PCT/EP 00/05006A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/025

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X | WO 95 01374 A (BRITISH TECH GROUP ; SHEPHERD PHILIP STEPHEN (GB)) 12 January 1995 (1995-01-12) abstract; claims | 1-27 |
| X | DE GRUIJL, TANJA D. ET AL.: "IMMUNE RESPONSES AGAINST HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) TYPE 16 VIRUS-LIKE PARTICLES IN A COHORT STUDY OF WOMEN WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA I DIFFERENTIAL T-HELPER AND IGG RESPONSES IN RELATION TO HPV INFECTION AND DISEASE OUTCOME" J GEN VIROL (1999) 80(2) 399-408, XP002149975 abstract page 401 | 1-27 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2000

Date of mailing of the international search report

30/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/05006

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 96 33737 A (EURO DIAGNOSTICA AB ;DILLNER JOAKIM (SE)) 31 October 1996 (1996-10-31) page 19; table 1A claims ---- | 1-27 |
| X | HEINO, P. ET AL.: "HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 CAPSIDS EXPOSE MULTIPLE TYPE-RESTRICTED AND TYPE-COMMON ANTIGENIC EPITOPES" J GEN VIROL (1995) 76(5) 1141-53, XP002149976 table 1 ---- | 1-27 |
| X | ZHOU J ET AL: "DEFINITION OF LINEAR ANTIGENIC REGIONS OF THE HPV16L1 CAPSID PROTEIN USING SYNTHETIC VIRION-LIKE PARTICLES" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 189, no. 2, 1992, pages 592-599, XP000882827 ISSN: 0042-6822 table 1 ---- | 1-27 |
| X | TSUKUI, TAKU ET AL.: "INTERLEUKIN 2 PRODUCTION IN VITRO BY PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN RESPONSE TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS-DERIVED PEPTIDES CORRELATION WITH CERVICAL PATHOLOGY" CANCER RES (1996) 56(17) 3967-3974, XP002149977 abstract; figure 1 ---- | 1-27 |
| X | WO 92 10513 A (UNIV QUEENSLAND ;CSL LTD (AU)) 25 June 1992 (1992-06-25) abstract; claims ---- | 1-27 |
| X | WO 92 05248 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 2 April 1992 (1992-04-02) page 21; claims 41,42 abstract ---- | 1-27 |
| X | EP 0 451 550 A (BEHRINGWERKE AG) 16 October 1991 (1991-10-16) abstract; claims ---- | 1-27 |
| X | WO 98 05790 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;GISSMANN LUTZ (DE); JOCHMUS INGRID (DE); KL) 12 February 1998 (1998-02-12) the whole document ---- | 1-27 |
| X | WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15 April 1999 (1999-04-15) the whole document ----- | 1-27 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05006

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9501374 A | 12-01-1995 | AU 7040594 A CA 2166333 A EP 0706533 A GB 2279651 A JP 8512045 T NZ 267682 A | 24-01-1995 12-01-1995 17-04-1996 11-01-1995 17-12-1996 28-10-1996 |
| WO 9633737 A | 31-10-1996 | AU 5520796 A EP 0824359 A US 5989548 A | 18-11-1996 25-02-1998 23-11-1999 |
| WO 9210513 A | 25-06-1992 | AT 189818 T AU 660954 B AU 9070991 A CA 2097916 A DE 69131992 D DE 69131992 T EP 0561885 A JP 6503559 T | 15-03-2000 13-07-1995 08-07-1992 13-06-1992 23-03-2000 29-06-2000 29-09-1993 21-04-1994 |
| WO 9205248 A | 02-04-1992 | AU 8762991 A CN 1067382 A | 15-04-1992 30-12-1992 |
| EP 0451550 A | 16-10-1991 | AU 650868 B AU 7351591 A CA 2038581 A JP 4217998 A PT 97073 A | 07-07-1994 26-09-1991 21-09-1991 07-08-1992 31-10-1991 |
| WO 9805790 A | 12-02-1998 | DE 19631357 A EP 0917586 A | 05-02-1998 26-05-1999 |
| WO 9918220 A | 15-04-1999 | AU 9684698 A EP 1021547 A NO 20001768 A | 27-04-1999 26-07-2000 02-06-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/025

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff genorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | WO 95 01374 A (BRITISH TECH GROUP ; SHEPHERD PHILIP STEPHEN (GB)) 12. Januar 1995 (1995-01-12) Zusammenfassung; Ansprüche | 1-27 |
| X | DE GRUIJL, TANJA D. ET AL.: "IMMUNE RESPONSES AGAINST HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) TYPE 16 VIRUS-LIKE PARTICLES IN A COHORT STUDY OF WOMEN WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA I DIFFERENTIAL T-HELPER AND IGG RESPONSES IN RELATION TO HPV INFECTION AND DISEASE OUTCOME" J GEN VIROL (1999) 80(2) 399-408, XP002149975 Zusammenfassung Seite 401 | 1-27 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

8 Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Oktober 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/10/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Cervigni, S

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | WO 96 33737 A (EURO DIAGNOSTICA AB ;DILLNER JOAKIM (SE)) 31. Oktober 1996 (1996-10-31) Seite 19; Tabelle 1A Ansprüche ---- | 1-27 |
| X | HEINO, P. ET AL.: "HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 CAPSIDS EXPOSE MULTIPLE TYPE-RESTRICTED AND TYPE-COMMON ANTIGENIC EPITOPES" J GEN VIROL (1995) 76(5) 1141-53, XP002149976 Tabelle 1 ---- | 1-27 |
| X | ZHOU J ET AL: "DEFINITION OF LINEAR ANTIGENIC REGIONS OF THE HPV16L1 CAPSID PROTEIN USING SYNTHETIC VIRION-LIKE PARTICLES" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, Bd. 189, Nr. 2, 1992. Seiten 592-599, XP000882827 ISSN: 0042-6822 Tabelle 1 ---- | 1-27 |
| X | TSUKUI, TAKU ET AL.: "INTERLEUKIN 2 PRODUCTION IN VITRO BY PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN RESPONSE TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS-DERIVED PEPTIDES CORRELATION WITH CERVICAL PATHOLOGY" CANCER RES (1996) 56(17) 3967-3974, XP002149977 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---- | 1-27 |
| X | WO 92 10513 A (UNIV QUEENSLAND ; CSL LTD (AU)) 25. Juni 1992 (1992-06-25) Zusammenfassung; Ansprüche ---- | 1-27 |
| X | WO 92 05248 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 2. April 1992 (1992-04-02) Seite 21; Ansprüche 41, 42 Zusammenfassung ---- | 1-27 |
| X | EP 0 451 550 A (BEHRINGWERKE AG) 16. Oktober 1991 (1991-10-16) Zusammenfassung; Ansprüche ---- | 1-27 |
| X | WO 98 05790 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ; GISSMANN LUTZ (DE); JOCHMUS INGRID (DE); KL) 12. Februar 1998 (1998-02-12) das ganze Dokument ---- | 1-27 |
| X | WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ; UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15. April 1999 (1999-04-15) das ganze Dokument ----- | 1-27 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung: die zur Patentfamilie gehören

Intern: Dokumentenzeichen

PCT/EP 00/05006

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9501374 A | 12-01-1995 | AU 7040594 A | 24-01-1995 |
| | | CA 2166333 A | 12-01-1995 |
| | | EP 0706533 A | 17-04-1996 |
| | | GB 2279651 A | 11-01-1995 |
| | | JP 8512045 T | 17-12-1996 |
| | | NZ 267682 A | 28-10-1996 |
| WO 9633737 A | 31-10-1996 | AU 5520796 A | 18-11-1996 |
| | | EP 0824359 A | 25-02-1998 |
| | | US 5989548 A | 23-11-1999 |
| WO 9210513 A | 25-06-1992 | AT 189818 T | 15-03-2000 |
| | | AU 660954 B | 13-07-1995 |
| | | AU 9070991 A | 08-07-1992 |
| | | CA 2097916 A | 13-06-1992 |
| | | DE 69131992 D | 23-03-2000 |
| | | DE 69131992 T | 29-06-2000 |
| | | EP 0561885 A | 29-09-1993 |
| | | JP 6503559 T | 21-04-1994 |
| WO 9205248 A | 02-04-1992 | AU 8762991 A | 15-04-1992 |
| | | CN 1067382 A | 30-12-1992 |
| EP 0451550 A | 16-10-1991 | AU 650868 B | 07-07-1994 |
| | | AU 7351591 A | 26-09-1991 |
| | | CA 2038581 A | 21-09-1991 |
| | | JP 4217998 A | 07-08-1992 |
| | | PT 97073 A | 31-10-1991 |
| WO 9805790 A | 12-02-1998 | DE 19631357 A | 05-02-1998 |
| | | EP 0917586 A | 26-05-1999 |
| WO 9918220 A | 15-04-1999 | AU 9684698 A | 27-04-1999 |
| | | EP 1021547 A | 26-07-2000 |
| | | NO 20001768 A | 02-06-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)